

Zur Lokalisierung und Spezifität
der Fettsäuresynthetase
aus Bäckerhefe

Wolfgang Pirson

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ZUR LOKALISIERUNG UND SPEZIFITÄT DER FETTSÄURESYNTHETASE
AUS BÄCKERHEFE

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Wolfgang Pirson
aus
München
1970

Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 22.4.1970



DISSERTATIONS- und FOTODRUCK FRANK, 8000 München 13, Tel.: 524607

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 1966 bis Oktober 1969 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen am Max-Planck-Institut für Zellchemie und am Biochemischen Institut der Universität München ausgeführt.

Herrn Professor Dr. F. Lynen
danke ich herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die er meiner Arbeit und mir gewährte.

Fräulein E. Ritter und Fräulein L. Schuhmann danke ich für ihre fleißige und zuverlässige Mitarbeit, mit der sie mich seit November 1968 unterstützten.

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Zur Lokalisierung der Fettsäuresynthetase in der Hefezelle	6
1. Zellaufschluß mit Hefeprotoplasten	7
2. Zellfraktionierungen	9
3. Rohrzuckergradienten	11
4. Markierungsversuche mit ^{14}C -Cholin	14
5. Zur Frage des Lipidgehaltes der Synthetase	18
a) Detergentien	18
b) Phospholipasen	19
c) Wirkung von Phospholipase D	20
III. Zur Spezifität der Fettsäuresynthetase	22
1. Fettsäuresynthese mit Pantethein-Derivaten	22
2. Abhängigkeit der Fettsäuresynthese von der Kettenlänge des Starters	30
3. Fettsäuresynthese mit Decanoyl-CoA als Starter	35
4. 3-Hydroxydecanoyl-CoA und 2-Decenoyl-CoA als Starter der Fettsäuresynthese	39
5. Start der Fettsäuresynthese mit "unnatürlichen" CoA-Derivaten	49
a) 4-Ketodecanoyl-CoA und 7-Ketodecanoyl-CoA	49
b) 3-Decenoyl-CoA und 9-Decenoyl-CoA	52
c) Weitere CoA-Derivate	53
d) Endproduktanalysen	55
6. Diskussion	65
IV. Experimenteller Teil	67
A. Allgemeine Methoden	67
1. Verwendete Geräte	67
2. Verwendete Präparate	68
3. Herstellung von Substraten	70
a) Acyl-CoA-Derivate	70
b) Sonstige Verbindungen	72
4. Bestimmung von Enzym-Aktivitäten	72
5. Bestimmung von Substratkonzentrationen	74
6. Sonstige Bestimmungsmethoden	76
a) Protein	76
b) Radioaktivität	77

II

	Seite
7. Gaschromatographische Analyse	77
a) Vorbereitung der Proben	77
b) Gaschromatographie	78
B. Beschreibung der Versuche	79
Zu Kap. II	
1. Kultivierung von Bäckerhefe	79
2. Bereitung von Protoplasten	80
3. Zellfraktionierung	81
4. Gradientenversuche	81
5. ^{14}C -Cholinmarkierung	83
6. Disk-Elektrophorese	85
7. Phospholipase D	85
Zu Kap. III	
Zu Abschnitt 1.	
1. Inkubationen mit 1- ^{14}C -Acetyl-pantethein	89
2. Synthese und Reinigung von Palmityl-pantethein	89
3. Palmityl-pantethein als Endprodukt	91
4. Palmityl-pantethein durch Austauschreaktion	91
Zu Abschnitt 2.	
Synthetasetest	92
Zu Abschnitt 3.	
Endprodukte der Synthese mit Decanoyl-CoA	92
Zu Abschnitt 4.	
1. DL-3-Hydroxydecansäure	93
2. 2-Decensäure	93
3. 3-Hydroxydecanoyl-CoA	93
4. 2-Decenoyl-CoA	94
5. Optische Tests	94
a) Zeitabhängigkeit	94
b) Zur Messung von ΔE_1	94
c) Vergleich von 3-Hydroxydecanoyl-CoA und 2-Decenoyl-CoA	95
d) 3-Hydroxypropionyl-CoA	95
e) Versuche mit NAM-Synthetase	95
6. Endproduktanalyse	96

III

	Seite
Zu Abschnitt 5.	
1. Synthese der Säuren	97
a) 4-Ketodecansäure	97
b) 7-Ketodecansäure	98
c) 10-Hydroxydecansäure	99
d) Sebacinsäuremonomethylester	100
e) Korksäuremonomethylester	101
2. Endproduktanalysen	101
V. Zusammenfassung	105
VI. Literaturverzeichnis	107
Lebenslauf	110

Verwendete Abkürzungen

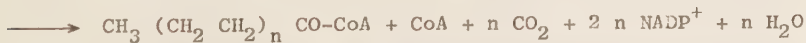
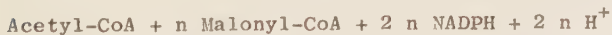
NAD ⁺	Diphosphopyridin-nucleotid, oxidiert
NADH	Diphosphopyridin-nucleotid, reduziert
NADP ⁺	Triphosphopyridin-nucleotid, oxidiert
NADPH	Triphosphopyridin-nucleotid, reduziert
NÄM	N-Äthylmaleinimid
KPO ₄	Kaliumphosphatpuffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethanpuffer
ATP	Adenosintriphosphat
CoA, CoASH	Coenzym A
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
Synthetase	Fettsäuresynthetase aus Bäckerhefe
DTNB	5,5-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure
THF	Tetrahydrofuran
Δ E	Extinktionsänderung, wenn nicht anders angegeben bei 334 mμ
E, mE	Internationale Einheit, Milli-Einheit
mE/mg	Spezifische Aktivität
RT	Raumtemperatur
Ipm	Impulse pro Minute
Upm, rpm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
NPGS	Neopentylglycolsuccinat
PEGS	Polyäthylenglycolsuccinat

I. Einleitung

Der Stoffwechsel der Fettsäuren zeigt besonders deutlich, daß ein Organismus die Fähigkeit besitzt, Aufbau und Abbau einer Substanz auf zwei verschiedenen Wegen vorzunehmen. Derart getrennter Ablauf ermöglicht dann eine unabhängige Regulation beider Reaktionsfolgen. Nach der Aufklärung des Abbauweges der Fettsäuren, der β -Oxidation, glaubte man zunächst, die Fettsäurebiosynthese könnte in Umkehrung dieser Reaktionsfolge verlaufen. Diese Überlegung lag nahe, da alle Reaktionen der β -Oxidation reversibel waren.

Beim Studium der de novo Fettsäurebiosynthese an verschiedenen Organismen (Lit. 1-5) ergaben sich jedoch unter anderem zwei wesentliche Punkte: Einmal beteiligt sich Malonyl-CoA am Kettenaufbau. Zum andern verlaufen alle Reaktionen, obgleich im wesentlichen in Umkehrung der bekannten Reaktionen der β -Oxidation, an einem einzigen Enzym, einem sogenannten Multienzymkomplex. Dabei sind die Acylreste als Thioester am Enzym gebunden, während bei der β -Oxidation ihre CoA-Ester reagieren.

In LYNENS Laboratorium wurde ein solcher Multienzymkomplex aus Bäckerhefe isoliert (Lit. 1). Dieses als Fettsäuresynthetase bekannte Enzym, ein einheitliches Protein vom Molekulargewicht $2,3 \times 10^6$, katalysiert die folgende Bruttoreaktion:



Mit Hilfe von Modells substraten, Acylderivaten von N-Acetylcysteamin oder Pantethein, konnten sieben verschiedene Teilreaktionen dieser Gesamtreaktion nachgewiesen werden. Den Teilreaktionen wurden eigene Enzym-Untereinheiten zugeordnet. Die kovalente Bindung der

Acyl-Reste an das Enzym, sowie die Existenz zweier verschiedener katalytisch aktiver Thiolgruppen, einer "zentralen" und einer "peripheren", führte zu einem Reaktionsschema der Fettsäuresynthese (Fig. 1), das bereits 1961 von LYNEN aufgestellt wurde (Lit. 1).

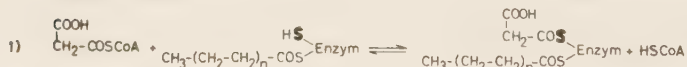
Auf Einzelheiten dieses Schemas kommen wir noch zurück.

START REAKTION (Acyl-Transfer):

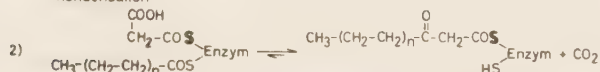


REAKTIONEN DER KETTENVERLÄNGERUNG

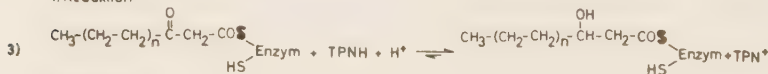
Malonyl-Transfer



Kondensation



1. Reduktion:



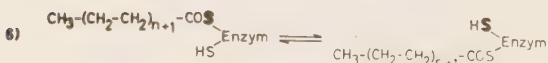
Dehydration:



2. Reduktion:



Acyl-Transfer



ABSCHLUSS-REAKTION (Palmityl-Transfer):



Fig. 1: Die chemischen Reaktionen der Fettsäuresynthese (Lit. 1)

SH-Gruppe in Fettdruck = "zentrale" SH-Gruppe

SH-Gruppe in Normaldruck = "periphere" SH-Gruppe

(TPN⁺ und TPNH = NADP⁺ und NADPH)

Betrachten wir zunächst die wesentlichen Merkmale der Fettsäurebiosynthese, die diese vom Fettsäureabbau unterscheiden. Vom chemischen Standpunkt aus ist die Beteiligung von Malonyl-CoA am Kettenaufbau der entscheidende Gesichtspunkt, der eine thermodynamische Begünstigung des Syntheseweges darstellt. Nicht weniger bedeutsam aber ist die Tatsache der räumlichen Nähe, in der sich alle Reaktionen am Enzymkomplex abspielen. Dies ergibt von selbst eine Trennung von Synthese- und Abbauweg, weshalb man auch von einer Kompartimentierung biochemischer Reaktionen auf kleinstem Raum spricht (Lit. 6). Diese Trennung geht aber offensichtlich in der Zelle noch weiter. Die Enzyme der β -Oxidation sind in sinnvoller Weise unmittelbar neben den Enzymen des Zitronensäurezyklus in den Mitochondrien lokalisiert. Dagegen betrachtet man den Multienzymkomplex der Fettsäuresynthetase als zytoplasmatisches Enzym ähnlich den Glykolyse-Enzymen (Lit. 7).

Geht man davon aus, daß enge Stoffwechselbeziehungen auch eine räumliche Nachbarschaft der beteiligten Enzyme nahe legen, so sollte man auch an die Möglichkeit einer mikrosomalen Bindung der Fettsäuresynthetase denken. Bei nahezu allen Enzymen der Lipid-Biosynthese handelt es sich um partikelgebundene Proteine. Als Beispiel für die Hefezelle sei das fettsäuredesaturierende Enzym genannt, das für die Bildung ungesättigter Fettsäuren aus langkettigen Acyl-CoA-Derivaten verantwortlich ist (Lit. 8,9). Ein anderes Beispiel stellt die von KUHN und LYNN (Lit. 10) untersuchte Transferase dar, die die Bildung von Phosphatidsäure aus Glycerin-1-phosphat und Palmityl-CoA katalysiert. Eine räumliche Nachbarschaft der Fettsäuresynthetase zu diesen Enzymen in der Zelle wäre durchaus denkbar. Wir versuchten daher die Fettsäuresynthetase in der Hefezelle mit biochemischen Methoden zu lokali-

sieren. Über diese Untersuchungen soll im ersten Teil dieser Arbeit berichtet werden. Wir berührten dabei auch die Frage eines Lipidgehaltes der Synthetase.

Galt unser Interesse zuerst dem Wirkungsort der Fettsäuresynthetase, so studierten wir im zweiten Teil dieser Arbeit am isolierten Enzym weitere Einzelheiten ihrer Wirkungsweise. Wir betrachten dazu das Reaktionsschema (Fig. 1):

In der Startreaktion wird ein Acetyl-Rest vom CoA auf das Enzym übertragen. Der Acetyl-Rest kondensiert mit einem auf die "zentrale" SH-Gruppe übertragenen Malonyl-Rest (Fig. 1) (1) unter Decarboxylierung zum Acetoacetyl-Rest (2). Als Thioester an der "zentralen" SH-Gruppe gebunden wird nun der β -Ketosäure-Rest in der 1. Reduktion zum β -Hydroxysäure-Rest (3), in der Dehydratisierung (4) zum α,β -ungesättigten und in der 2. Reduktion (5) zum gesättigten Acyl-Rest umgewandelt. Nach Übertragung des gesättigten Acyl-Restes, zuerst des Butyryl-Restes, auf die "periphere" SH-Gruppe (6) wiederholen sich die Reaktionen zyklisch bis eine Kettenlänge von etwa 16-18 Kohlenstoffatomen erreicht ist. In einer Abschlußreaktion, dem Palmityl-Transfer, wird der Acyl-Rest dann wieder auf Coenzym A übertragen.

Die Natur der "zentralen" und "peripheren" SH-Gruppe ist geklärt (Lit. 11). 4'-Phosphopantethein, ein Teilstück des Coenzym A, trägt die "zentrale" SH-Gruppe und wirkt als "molekularer Arm", der die Acyl-Reste von einem Teilenzym zum anderen weiterreicht. Die "periphere" SH-Gruppe gehört zu einem Cystein-Rest des Enzyms für die Kondensation.

Unter den Einzelreaktionen der Synthese (Fig. 1) beanspruchen neben der Kondensationsreaktion, die als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Gesamtreaktion erkannt worden ist (Lit. 12), die Acyltransfer-Reaktionen ein besonderes Interesse, die den Beginn und den Abschluß der Reaktionsfolge darstellen. Welchen Einfluß haben die hierbei beteiligten Transferasen auf die Gesamtsynthese? Die Vermutung, für die Endproduktsverteilung sei die Spezifität der Palmityl-transferase verantwortlich, wurde von SCHWEIZER (Lit. 13) bereits widerlegt. Neuerdings wurde eine andere Erklärung für den Kettenabbruch gegeben (Lit. 14). Der Acyltransfer zu Beginn der Reaktionsfolge aber ist weiter Gegenstand der Untersuchungen. Beladungsversuche an der Synthetase mit radioaktiven Substraten ergaben die Existenz von nicht-thiolartigen Bindungsstellen für Acyl-Reste neben den SH-Gruppen. Figur 2 zeigt schematisch die heutige Vorstellung vom detaillierten Ablauf der Acyltransfer-Schritte, die den Syntheseyklus einleiten (Lit. 15).

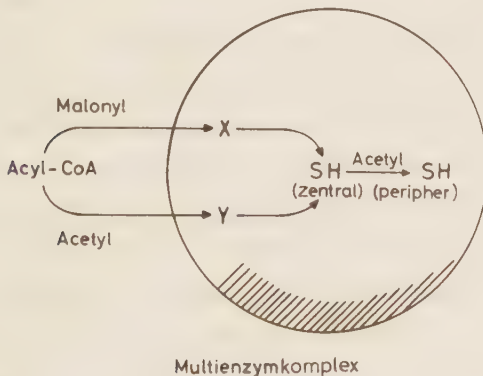


Fig. 2: Schema der einleitenden Acyltransfer-Reaktionen am Synthetase-Komplex (Lit. 15)

Demnach gelangt der Acetyl-Rest über eine nicht-thiolartige, sogenannte Y-Gruppe, der Malonyl-Rest über eine sogenannte X-Gruppe auf die "zentrale" SH-Gruppe. Nur der Acetyl-Rest - und seine höheren Homologen - wird weiter auf die "periphere" SH-Gruppe übertragen, der Malonyl-Rest bleibt auf der "zentralen" SH-Gruppe.

Im zweiten Teil dieser Arbeit berichten wir über Versuche mit Substratanalogen, die wir anstelle der natürlichen Substrate Acetyl-CoA und Malonyl-CoA in die enzymatische Fettsäuresynthese einsetzten. Durch diese Spezifitätsuntersuchungen hofften wir, ein klareres Bild über die Teilreaktionen der Synthese insbesondere über deren einleitende Acyltransfer-Schritte zu erhalten.

II. Zur Lokalisierung der Fettsäuresynthetase in der Hefezelle

Die feste Zellwand der Hefe, zur Hauptsache aus Glucan und Mannan bestehend (Lit. 16), bedingt grundsätzlich eine grobe Zellaufschlußmethode, bei der die Erhaltung von Zellstrukturen sehr fraglich bleibt. Es wäre daher denkbar, daß die allgemein als löslicher Enzymkomplex des Zytoplasmas angesehene Fettsäuresynthetase (Lit. 7) erst durch die Aufschlußmethode in Lösung gebracht wird. Zumindest darf man nicht erwarten, daß eine lockere Assoziation der Synthetase mit Zellpartikeln bei der üblichen Aufschlußmethode mit Glasperlen vollständig erhalten bleibt. Um eine derartige Veränderung des Zustandes in der Zelle beim Zellaufschluß möglichst zu vermeiden, suchten wir nach einer schonenden Aufschlußmethode.

1. Zellaufschluß mit Hefeprotoplasten

EDDY und WILLIAMSON berichteten 1957 erstmals (Lit.17) über Protoplasten von Hefezellen, die sie durch enzymatischen Abbau der äußeren Zellwand erhielten. Protoplasten, oft auch Sphäroplasten genannt⁺⁾ , besitzen nur noch die äußere Zytoplasmamembran, die leicht zerstört werden kann. Hierzu genügt schon der osmotische Druck. Zum Abbau der Zellwand dient meist ein Enzymgemisch aus dem Verdauungstrakt der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*). In zunehmendem Maße werden Hefeprotoplasten als Material verwandt, um intakte Mitochondrien aus der Hefezelle zu erhalten (Lit. 19). Meist wird von Bierhefe (*Saccharomyces carlsbergensis*) ausgegangen, da deren Zellwand von den betreffenden Enzymen leichter angegriffen wird als die der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Bei der Bäckerhefe kann nur nach Vorbehandlung der Zellen mit Thiolen eine Protoplastenbildung erreicht werden (Lit. 20,21).

In Anlehnung an Untersuchungen von SUOMALAINEN et al. (Lit. 21) wurde ein Verfahren zur Darstellung von Protoplasten aus Bäckerhefe ausgearbeitet (Einzelheiten s. Exptl. Teil, S. 30). Die Bildung der Protoplasten konnte qualitativ unter dem Mikroskop verfolgt werden, wo diese sich deutlich durch ihre kreisrunde Form von intakten ovalen Hefezellen unterschieden. Außerdem ließen Protoplasten keine dicke Zellwand mehr erkennen. Da Protoplasten nur in isotonischer Lösung stabil sind, erfolgten die Inkubationen mit dem Schneckenenzym ("Helicase") in isotonischem

⁺⁾ Einzelheiten zur Protoplastenbildung und Nomenklaturfragen
s. Lit. 18.

Medium. In hypotonischer Lösung platzten die Protoplasten infolge des osmotischen Druckes. Da dies zu einer Verminderung der Trübung in der Suspension führte, konnten wir durch Trübungsmessungen in isotonisch und hypotonisch verdünnter Lösung die Protoplastenbildung verfolgen (Fig. 3).

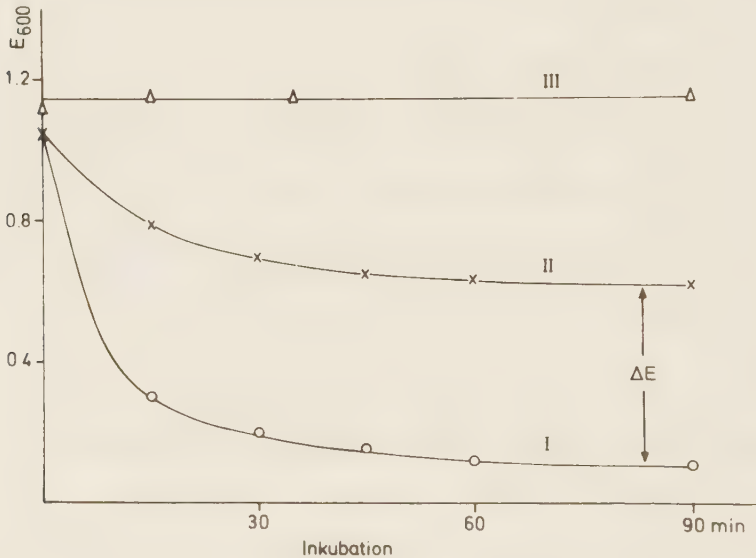


Fig. 3: Bildung von Hefeprotoplasten mit "Helicase" (Trübungsmessung) (Einzelheiten s. Expt. Teil S. 80)

- I Hefe + Helicase (hypotonische Verdünnung)
- II Hefe + Helicase (isotonische Verdünnung)
- III Hefe ohne Helicase (Kontrolle)

Der Unterschied zwischen beiden Werten (ΔE zwischen Kurve I und Kurve II) galt als Maß für die Protoplastenausbeute. Auch bei isotonischer Verdünnung (Fig. 3, Kurve II) zeigte sich eine Abnahme der Trübung, die bei der Kontrolle, die wir mit vorbe-

handelter Hefe (s. unten) ohne "Helicase" ausführten, nicht zu beobachten war (Kurve III). Diese Erscheinung beruhte wohl auf der Verkleinerung der Zellen durch Abbau der Zellwand, der Lysis einiger Zellen und dem Abbau von zerstörten Zellen.

Wie erwartet gelang im Gegensatz zu Versuchen mit Bierhefe die Protoplastenbildung bei der Bäckerhefe erst nach Vorbehandlung der Hefezellen mit Thioglykol (s. S. 80).

Wesentlich für befriedigende Ausbeuten an Protoplasten war das Alter der Hefezellen. Wir verwendeten Hefezellen, die sich in der frühen bis mittleren logarithmischen Wachstumsphase befanden (s. Expt. Teil S. 79, Fig. 39). Später ist die Zellwand anscheinend so verändert, daß sie dem enzymatischen Angriff nicht mehr voll zugänglich ist.

Die gewaschenen Protoplasten wurden in 0,25 M Zuckerlösung nach Potter-Elvehjem (Lit. 22) homogenisiert (s. Expt. Teil S. 81). Dieses Verfahren wurde einer Osmolyse der Protoplasten vorgezogen, da ein hypotonisches Medium, wie es die Protoplasten zu ihrer Osmolyse erfordert hätten, auch die Strukturen von Zellpartikeln hätte schädigen können (Lit. 23). Die erhaltenen Homogenate wurden unmittelbar weiter verarbeitet.

2. Zellfraktionierung

Zur Auftrennung des Zellinhaltes in verschiedene Fraktionen diente das einfache Prinzip der fraktionierten Zentrifugation. Die Homogenate aus Protoplasten wurden nach dem angegebenen Schema (Fig. 4) fraktioniert (Lit. 23,19). Die in Klammern angege-

benen Bezeichnungen der Fraktionen sollen nur zu ihrer Charakterisierung dienen. Sie beanspruchen keine strenge Gültigkeit, da die Fraktionen nicht auf Einheitlichkeit geprüft wurden.

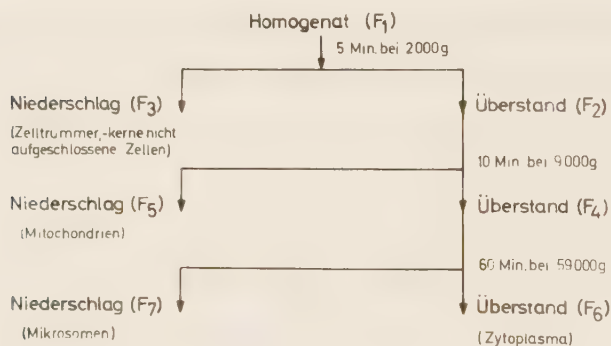


Fig. 4: Fraktionierungsschema

Wir bestimmten in den Fraktionen die Aktivität der Synthetase im radiochemischen Test durch Einbau der Radioaktivität aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA in höhere Fettsäuren (s. Expt. Teil S.73). Tabelle 1 zeigt das Ergebnis eines Fraktionierungsversuches.

Tabelle 1

Fraktion	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇
Synthetase-Aktivität in mE	375	322	30	335	4	189	44
% der eingesetzten Aktivität	100	36	3	89,3	1,1	50,5	11,7
mg Protein	99	51,3	47,1	30,8	3,8	28,2	4,1
Spez. Aktivität mE/mg Protein	3,8	6,3	0,6	8,4	1,1	6,7	10,8

Im Niederschlag F_5 , der Mitochondrienfraktion, fand sich kaum Aktivität. Wir fanden hier nie mehr als 2 % der Aktivität des Rohextraktes. Den in Fraktion F_3 gefundenen 8 Prozent der Aktivität kommt wohl angesichts der starken Heterogenität der Fraktion keine große Bedeutung zu. Diese Fraktion enthielt ja auch noch nicht aufgeschlossene Zellen. Mit besseren Protoplasten fanden wir hier später nur noch 4 % der Gesamtaktivität. Die Hauptaktivität befand sich im mitochondrienfreien Überstand F_4 .

Die Verteilung der Aktivität auf den Niederschlag F_7 (Mikrosomen) mit 12 % und auf den Überstand F_6 (Zytoplasma) mit 51 % erscheint zwar zuerst etwas überraschend. Man muß jedoch die Größe des Synthetaskomplexes bedenken (Molgewicht $2,3 \times 10^6$), der unter diesen Bedingungen der Zentrifugation bereits sedimentierte. Bei einem Kontrollversuch mit isolierter Synthetase unter den gleichen Bedingungen wurden im Niederschlag ($\hat{=}$ F_7) 16 %, im Überstand ($\hat{=}$ F_6) 52 % der eingesetzten Aktivität gefunden.

So gesehen ergaben diese Fraktionierungsversuche keinen Hinweis auf eine Bindung der Synthetase an größere Zellstrukturen.

3. Rohrzuckergradienten

Eine nicht zu lockere Bindung der Synthetase an größere Zellstrukturen sollte sich besonders deutlich im Sedimentationsverhalten der Synthetase in einem linearen Gradienten von 5-20 % Rohrzucker ausdrücken. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins in diesem Gradienten (Lit. 24) ist von der Zuckerkonzentration weitgehend unabhängig. Die Sedimentationsgeschwindigkeit und damit die Wanderungsstrecke im Gradienten von strukturgebundener Synthe-

tase sollte größer sein als die von isolierter Synthetase. Man würde also eine entsprechend andere Lage des Aktivitätsmaximums im Gradienten erwarten. Läge gebundene Synthetase neben freier Synthetase vor, so sollte man zwei oder mehrere Aktivitätsgipfel erhalten.

Wir zentrifugierten den mitochondrienfreien Überstand F_4 in einem Zuckergradienten (s. Expt. Teil S.81) und fraktionierten danach den Gradienteninhalt. In den Fraktionen wurde die Synthetaseaktivität im radiochemischen Test (s. Expt. Teil S.73) bestimmt. In einem Kontrollgradienten wurde unter gleichen Bedingungen gereinigte Synthetase zentrifugiert, deren Verteilung im Gradienten im optischen Test bestimmt wurde.

Figur 5 zeigt die Analyse eines solchen Gradienten. Wir fanden nur ein einziges Maximum der Synthetaseaktivität,^{*)} dessen Lage genau mit dem gereinigter Synthetase (externe Kontrolle) übereinstimmte. Nach der Extinktion der Fraktionen bei 280 m μ enthalten die unteren und die oberen Fraktionen des Gradienten erwartungsgemäß die Hauptmenge an Protein (und Nucleinsäuren). In den oberen, weniger konzentrierten Fraktionen befanden sich die "leichten" Enzyme des Zytoplasmas. Dies bestätigte die Aktivitätsverteilung von Alkoholdehydrogenase (ADH) und Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G-6PDH) (Fig. 5). In den unteren konzentrierteren Fraktionen vermuteten wir die Mikrosomen. Der Nachweis dafür wurde später erbracht (s. Abschnitt 4).

*) Über ähnliche Beobachtungen berichtete auch H.P. KLEIN (Lit.71).

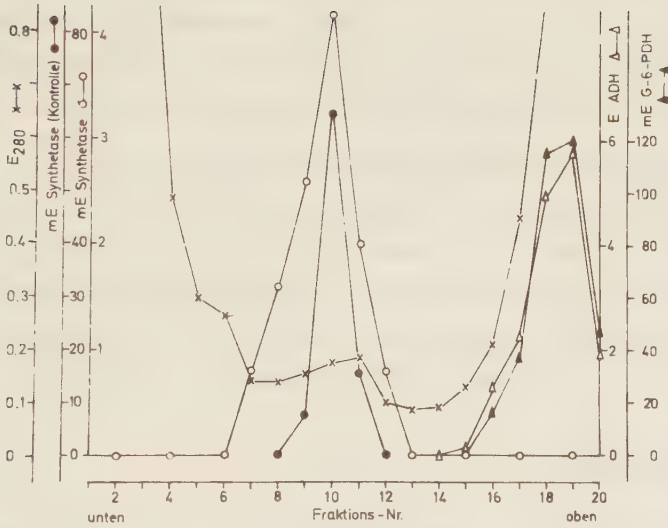


Fig. 5: Analyse des mitochondrienfreien Überstandes F_4 im Rohrzuckergradienten (Einzelheiten s. Expt. Teil S. 82).

o --- o mE Synthetase
 ● --- ● mE Synthetase im Kontrollgradienten
 Δ --- Δ E Alkoholdehydrogenase (ADH)
 ▲ --- ▲ mE Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH)
 x --- x E_{280}

Wir unternahmen auch mit Fraktion F_7 Gradientenexperimente. In dieser "mikrosomalen" Fraktion sollte der eventuelle Anteil an partikelgebundener Synthetase natürlich erheblich größer sein als in Fraktion F_4 . Wir erhielten jedoch auch hier im Gradienten nur einen einzigen Gipfel der Synthetaseaktivität und fanden keine Veränderung der Lage des Aktivitätsmaximums gegenüber der Kontrolle mit gereinigter Synthetase.

Diese Versuche ergaben eindeutig, daß Synthetase aus Protoplasten-homogenaten sich im Gradienten nicht anders verhielt als das ge-reinigte Enzym. Wir erhielten auch aus diesen Experimenten keinen Hinweis für eine Bindung der Synthetase an Zellstrukturen.

Unter den geschilderten schonenden Bedingungen erscheint die Fettsäuresynthetase somit als ein lösliches Protein. Es besteht allerdings in der Zelle trotzdem die Möglichkeit einer lockeren Assoziation mit Membranstrukturen. Mit den klassischen bioche-mischen Methoden läßt sich dafür aber der Nachweis nicht erbrin-gen.

4. Markierungsversuche mit ^{14}C -Cholin

Diese Versuche dienten dazu, die Trennung von Mikrosomenfraktio-nen mit Synthetase in Rohrzuckergradienten (s. oben S. 12) sicher-zustellen. Wir markierten die Membranen und damit auch den Mem-brananteil der Mikrosomen, indem wir Hefe in ^{14}C -Cholin-haltigem Medium wachsen ließen (s. Expt. Teil S. 83). Nach Protoplasten-bildung und Vorfraktionierung zentrifugierten wir Fraktion F_4 wie oben beschrieben (S. 12 und Expt. Teil S. 83) in einem Zucker-gradienten. Neben der Synthetaseaktivität bestimmten wir die Radioaktivität in den Gradientenfraktionen. Das Ergebnis (Fig. 6) zeigte wie üblich Übereinstimmung des Aktivitätsgipfels der Synthetase mit der Kontrolle. Radioaktivität fanden wir nur in den unteren und zur Hauptsache in den oberen Fraktionen.

Wir konnten nur die Gesamtradioaktivität der einzelnen Fraktionen bestimmen, da die Impulszahl nicht zur genaueren Analyse einzel-ner Fraktionen ausreichte. Die Radioaktivitätsbilanz des ganzen

Versuches sah folgendermaßen aus: Aus dem Medium wurden zwar 30 % der eingesetzten Radioaktivität (18×10^6 Ipm) von den Hefezellen aufgenommen, in den Protoplasten fanden wir jedoch nur noch 12,5 % und im mitochondrienfreien Überstand F_4 waren es schließlich noch 8 % ($1,45 \times 10^6$ Ipm). Aus methodischen Gründen konnte allerdings nur ein Sechstel von F_4 auf den Gradienten aufgesetzt werden (242 000 Ipm).

Da uns aber trotzdem interessierte, welcher Teil der Radioaktivität wirklich einer Membranmarkierung entsprach, untersuchten wir die radioaktiven Verbindungen in den vereinigten Fraktionen

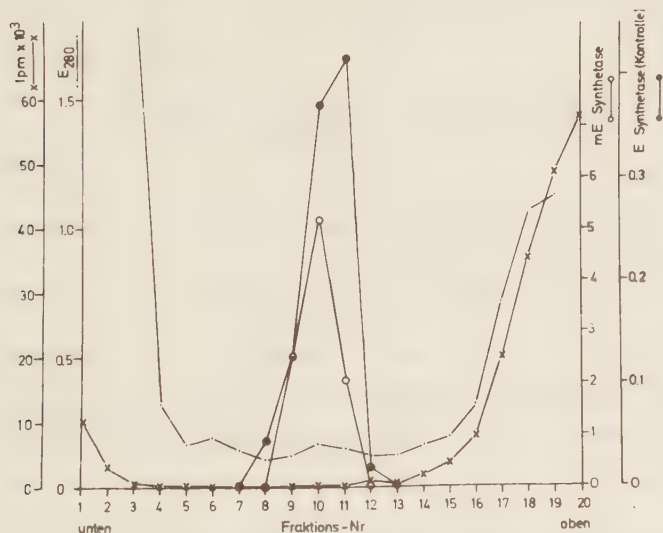


Fig. 6: Analyse des mitochondrienfreien Überstandes F_4 nach ^{14}C -Cholin-Markierung im Rohruckergradienten (Einzelheiten s. Expt. Teil S. 83).

- o --- o mE Synthetase
- --- • E Synthetase im Kontrollgradienten
- . --- . E_{280}
- x --- x Gesamtradioaktivität

1-3 und 15-20. Wir konnten mit Papier- und Dünnschichtchromatographie zeigen, daß in den Fraktionen 1-3 Lecithin der radioaktive Hauptbestandteil war (Fig. 7). In den Fraktionen 15-20 fielen nur 8 % der Radioaktivität auf Lecithin, der Rest konnte wasserlöslichen Verbindungen zugeordnet werden (s. unten).

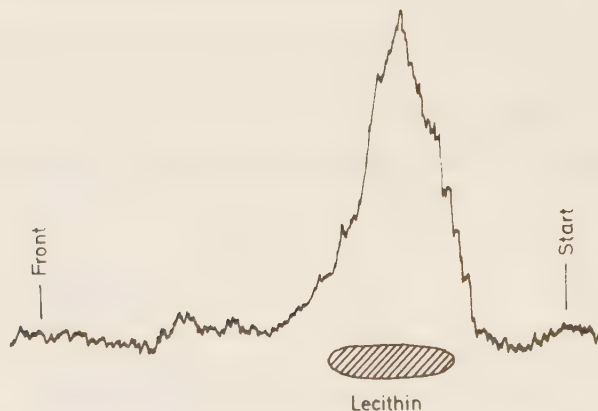


Fig. 7: Radiodünnschichtchromatogramm von Lecithin aus Fraktion 1-3 (s. Fig. 6)

(Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65 : 25 : 4)

Die Radioaktivität der Fraktionen 1-3 entsprach also tatsächlich einer Markierung der mikrosomalen Membranen. Damit war auch die Trennung von mikrosomaler Fraktion und Synthetase im Gradienten bestätigt.

Der Umstand, daß wir keine Markierung in den Fraktionen fanden, die Synthetase enthielten, darf angesichts des geringen ^{14}C -Cholin-Einbaus allerdings nicht als Nachweis für die Abwesenheit von Lipiden gewertet werden. Für einen derartigen Nachweis wäre es erstens günstig, mit Cholin-Mangelmutanten der Hefe zu arbeiten und zweitens wäre längeres Wachstum der Zellen vorteilhaft.

Bei der Untersuchung der aus einem Protoplastenhomogenat isolierten wasserlöslichen radioaktiven Substanzen fanden wir drei Verbindungen. Es gelang uns jedoch nur, die Hauptkomponente als unverändertes Cholin zu identifizieren. In den anderen beiden Verbindungen vermuteten wir zunächst Phosphorylcholin und CDP-Cholin⁺⁾ , die nächsten Umwandlungsprodukte des Cholins auf dem Biosyntheseweg zum Lecithin (Lit. 25). Deren Verhalten in der Papierchromatographie und Papierelektrophorese entsprach jedoch nicht dem der radioaktiven Substanzen (Fig. 8). Weitere Identifizierungsversuche wurden nicht unternommen. Möglicherweise ist auch Betain, das Oxidationsprodukt des Cholins, eine der radioaktiven Verbindungen.

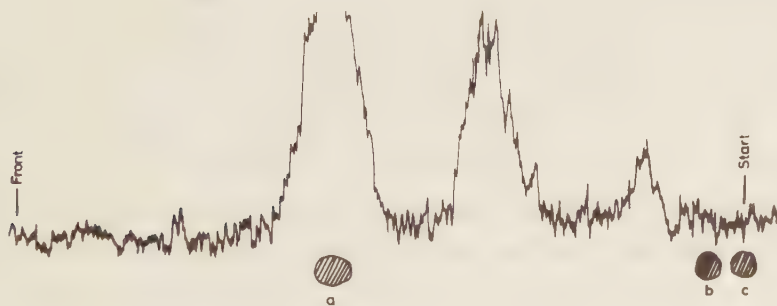


Fig. 8: Papierchromatogramm der wasserlöslichen Umwandlungsprodukte von ^{14}C -Cholin (Whatman 1; Äthanol/Wasser 8:1)

a) Cholin, b) Phosphorylcholin, c) CDP-Cholin

⁺⁾ CDP-Cholin = Cytidin-5'-Diphospho-Cholin.

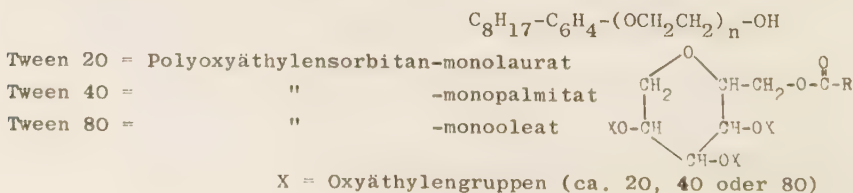
5. Zur Frage des Lipidgehaltes der Synthetase

Wir hatten keine Bindung der Synthetase an Membranen feststellen können. Aber es erschien immerhin möglich, daß Lipidstrukturen in der Synthetase enthalten waren, auch im gereinigten Enzym. Falls dieser Lipidgehalt für die Aktivität der Synthetase von Bedeutung wäre, müßte man eine Veränderung der Aktivität feststellen können, wenn man Synthetase mit Agentien behandelt, die Membranstrukturen auflösen. Wir unternahmen derartige Versuche mit Detergentien und Phospholipasen.

a) Detergentien

Wir beschränkten uns auf nichtionogene Detergentien, um eine Denaturierung des Enzyms, wie sie durch ionogene Detergentien erfolgen kann (Lit. 26), auszuschließen. Wir hatten beobachtet, daß schon 0,04 Vol.% Triton-X-100 genügten, um die Membranen von Protoplasten aufzulösen. Wir behandelten nun gereinigte Synthetase mit 1 %igen Lösungen von Triton-X-100, Tween 20, Tween 40 und Tween 80^{*)}, konnten aber in keinem Fall einen Aktivitätsverlust feststellen. Auch in der Disk-Gelelektrophorese war keine Veränderung gegenüber unbehandelter Synthetase zu bemerken.

*) Triton = Octylphenol-polyäthylenglycoläther,



b) Phospholipasen

Phospholipasen zerstören Membranen durch Abbau der Phosphatide. So spaltet Phospholipase A den Acylrest eines Phosphatides in β -Stellung ab. Phospholipase D spaltet die Phosphodiesterbindung von Lecithin unter Bildung von Phosphatidsäure und Cholin.

Phospholipase A hatte keinen Einfluß auf die Aktivität der Synthetase.

Phospholipase D aber inaktivierte die Synthetase langsam (Fig. 9). Bei der Beurteilung dieser Inaktivierung war jedoch Vorsicht geboten, da die erhältlichen Phospholipase D-Präparate sehr rohe Enzympräparate waren. Es war durchaus möglich, daß diese Inaktivierung von Verunreinigungen des Präparates herrührte. Eine spezifische Wirkung auf Phospholipide erschien uns jedenfalls nicht wahrscheinlich (s. unten), und wir werteten diesen Effekt der Phospholipase D nicht als Hinweis auf einen Lipidanteil der Synthetase. In der Diskelektrophorese war wiederum keine Veränderung gegenüber unbehandelter Synthetase zu bemerken außer den zusätzlichen Proteinbanden der Phospholipasen.

Nach diesen Experimenten sieht es so aus, daß ein Lipidanteil der Synthetase zumindest für die Enzymaktivität keine Bedeutung besitzt. Die Beobachtung OESTERHELTS (Lit. 27), daß hochgereinigte Synthetase fast keinen Gehalt an höheren Fettsäuren aufweist, spricht sogar gegen jeglichen Lipidgehalt der Synthetase.

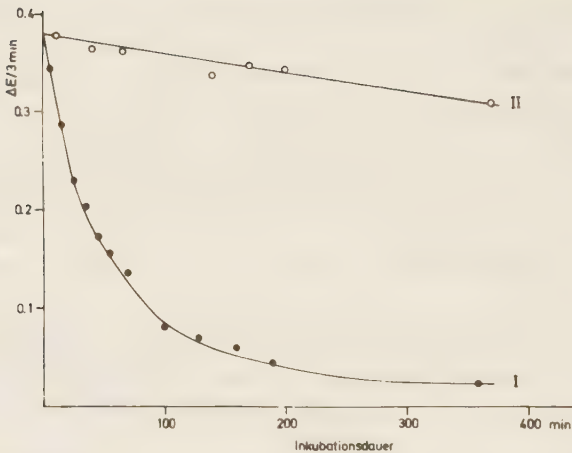


Fig. 9: Inaktivierung der Synthetase durch Phospholipase D
(Einzelheiten s. Exptl. Teil S. 85)

- I Synthetase + Phospholipase D
II Synthetase allein (Kontrolle)

c) Wirkung von Phospholipase D

Die Inaktivierung der Synthetase durch Phospholipase D wurde noch genauer untersucht (s. auch Exptl. Teil S. 85).

Während Phospholipase D Calcium - Ionen zur Aktivität benötigt (Lit. 28), konnten wir keinen Einfluß von Ca^{2+} bei der Inaktivierung beobachten. Auch EDTA (10^{-2}M) war ohne Einfluß auf die Inaktivierung. Dies war einer der Gründe, warum wir die Inaktivierung durch Phospholipase D nicht auf eine Phospholipidspaltung (s. oben) zurückführten.

Wie schon erwähnt, war wegen der geringen Reinheit des Präparates Vorsicht bei der Beurteilung dieser Inaktivierung geboten.

Für eine enzymatische Wirkung sprach der Umstand, daß zwar nach Dialyse des Präparates noch Inaktivierung der Synthetase beobachtet wurde, nicht mehr aber nach längerem Kochen des Präparates⁺⁾ .

Die unspezifische Inaktivierung durch eine eventuell vorhandene Proteinase konnte ausgeschlossen werden (s. Exptl. Teil S. 85 (Lit. 63)).

Interessant war die Feststellung, daß eine zu 70 % inaktivierte Synthetase die Teilreaktionen Acetyltransfer, 1. Reduktion und 2. Reduktion noch voll katalysieren konnte (s. Exptl. Teil S.86). Dieser Erhalt der Teilaktivitäten bei überwiegendem Verlust der Gesamtaktivität sprach für eine spezifische Inaktivierung.

Wir glaubten zunächst eine Erklärung gefunden zu haben, als wir starke Phosphodiesterase-Aktivität des Präparates feststellen konnten. Es erschien uns möglich, daß an der Synthetase die Phosphodiesterbindung des 4'-Phosphopantetheins mit Serin durch diese Phosphodiesterase gespalten wurde. Das hätte eine Abspaltung der "zentralen" SH-Gruppe mit ihrem Trägerarm (s. Einleitung) bedeutet, die bisher mit Phosphodiesterasen anderer Herkunft nicht gelang (Lit. 30). Ein derartiges Apoenzym hätte möglicherweise die genannten Teilschritte noch katalysieren können. Für diese Vorstellung erhielten wir allerdings keine Bestätigung: Die mikrobiologische Pantothersäurebestimmung⁺⁺⁾ einer proteinfreien Lösung, die aus einem Inaktivierungsansatz stammte, ergab nur 10 % des erwarteten Pantothersäuregehaltes (s. Exptl. Teil S. 88).

+) Eine relativ große Hitzestabilität wird auch für Phospholipase D beschrieben (Lit. 29).

++) Wir danken Herrn W. Winnewisser für die Ausführung dieser Bestimmung.

Wir konnten schließlich noch feststellen, daß die Synthetase durch Cystein und Dithiothreitol (DTT) (je $10^{-3}M$) vor Inaktivierung durch das Phospholipase-D-Präparat geschützt wurde. Eine Reaktivierung aber gelang uns mit diesen Thiolverbindungen nicht. Auf weitere Untersuchungen mußten wir verzichten, da sie im Rahmen dieser Arbeit zu weit geführt hätten. Wir konnten zwar die Wirkung von Phospholipase D auf Synthetase nicht eindeutig erklären, aber immerhin eingrenzen und näher charakterisieren. Die eindeutige Klärung dieser Frage dürfte auch weiterhin problematisch bleiben, solange nicht reinere Phospholipase-D-Präparate zur Verfügung stehen.

III. Zur Spezifität der Fettsäuresynthetase

Wie schon einleitend bemerkt, betraf dieser Teil der Arbeit Versuche mit Substratanalogen der Fettsäuresynthetase. Wir beschreiben im folgenden im wesentlichen kinetische Experimente, bei denen die fettsäuresynthetisierende Aktivität der Synthetase mit verschiedenen Substraten anhand des NADPH-Verbrauches gemessen wurde. Da wir damit die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion erfaßten, war eine Deutung der kinetischen Daten im Hinblick auf einzelne Teilschritte der Reaktion ~~oder~~ Teilenzyme der Synthetase prinzipiell problematisch, sie wurde aber in manchen Fällen versucht.

1) Fettsäuresynthese mit Pantethein-Derivaten

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Fettsäuresynthese ist die Kondensationsreaktion (Lit. 12), bei der Acetyl- und

Malonyl-Rest bereits enzymgebunden vorliegen (s. Schema S. 2). Alle anderen Teilreaktionen müssen rascher verlaufen, auch die Transfer-Reaktionen. Ersetzt man den CoA-Teil der Substrate durch eine andere Thiolverbindung, so entscheidet sich bei den Transfer-Reaktionen, ob Synthese stattfindet und gegebenenfalls wie rasch. Denn nur an diesen Reaktionen ist der SH-Teil der Substrate beteiligt (s. Schema Fig. 1), dem gegenüber sich eine eventuelle Spezifität der Transferasen auswirken kann.

Wir ersetzten CoA durch Pantethein, verwendeten also Acetyl- und Malonyl-pantethein statt der CoA-Derivate als Substrate. Wir beobachteten eine hohe Enzymaktivität, die im Sättigungsbereich beider Substrate 80 % der Synthetaseaktivität mit CoA-Derivaten erreichte. Die Enzymabhängigkeit zeigt Figur 10, die Substratabhängigkeit für Malonyl- und Acetyl-pantethein Figur 11. Wir bestimmten nach Lineweaver-Burk die Michaeliskonstanten von Malonyl-pantethein und Acetyl-pantethein (s. Tabelle 2). Zum Vergleich seien Werte für die CoA-Derivate (Lit. 31) angegeben. Es sei aber hinzugefügt, daß diese Werte nur für die angegebenen Bedingungen gelten. Eine Konzentrationsänderung des jeweiligen zweiten Substrates kann zu völlig anderen Werten führen, wie dies ein Beispiel für Acetyl-pantethein zeigt bei einer geringeren Malonyl-pantethein-Konzentration.

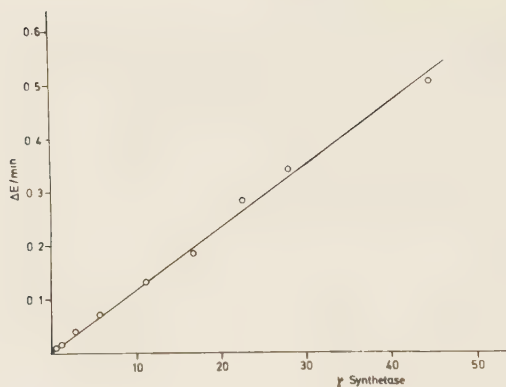


Fig. 10: Enzymabhängigkeit der Fettsäuresynthese mit Pantethein-Derivaten. (Standard-Synthetasetest; statt CoA-Derivate Pantethein-Derivate) $2,25 \times 10^{-4}$ M Acetyl-pantethein, $2,95 \times 10^{-4}$ M Malonyl-pantethein, angegebene Mengen Synthetase (2350 mE/mg).

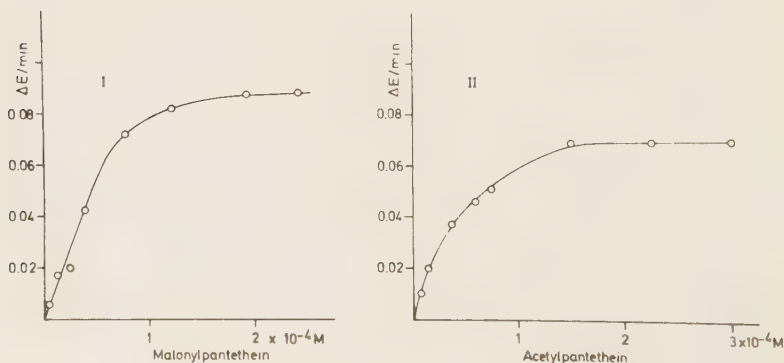


Fig. 11: Substratabhängigkeit der Fettsäuresynthese mit Pantethein-Derivaten. (Standard-Synthetasetest; statt CoA-Derivate Pantethein-Derivate)

I für Malonyl-pantethein ($2,25 \times 10^{-4}$ M Acetyl-pantethein;
8,3 γ Synthetase (2300 mE/mg))

II für Acetyl-pantethein ($2,95 \times 10^{-4}$ M Malonyl-pantethein;
6 γ Synthetase (2400 mE/mg)).

Tabelle 2

	K_M	Bedingungen	
Acetyl-pantethein	$5,0 \times 10^{-5} M$	$2,95 \times 10^{-4} M$	Malonyl-pantethein (Fig. 11)
Malonyl-pantethein	$8,7 \times 10^{-5} M$	$2,25 \times 10^{-4} M$	Acetyl-pantethein (Fig. 11)
Acetyl-CoA	$7,3 \times 10^{-6} M$	$2,0 \times 10^{-5} M$	Malonyl-CoA (Lit. 31)
Malonyl-CoA	$8,0 \times 10^{-6} M$	$3,0 \times 10^{-5} M$	Acetyl-CoA (Lit. 31)
Acetyl-pantethein	$1,8 \times 10^{-5} M$	$7,7 \times 10^{-5} M$	Malonyl-pantethein

Wir messen daher einem Vergleich der Michaeliskonstanten wenig Bedeutung zu.

Weitere Untersuchungen sollten zeigen, wie weit sich die panteinabhängige Fettsäuresynthese von der normalen Fettsäuresynthese mit CoA-Derivaten unterscheidet.

Zunächst stellten wir fest, daß die bei der Inkubation gebildeten höheren Fettsäuren in gebundener Form vorlagen. Wir inkubierten Synthetase mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-pantethein, NADPH und Malonyl-pantethein und beendeten die Reaktion durch Perchlorsäure-Zusatz. Die eine Hälfte des Ansatzes wurde sofort mit Petroläther extrahiert (Extrakt A), die andere erst nach alkalischer Hydrolyse (Extrakt B). Bei der radiogaschromatographischen Analyse der beiden Extrakte zeigte sich, daß der größte Teil der gebildeten radioaktiven Fettsäuren erst nach alkalischer Hydrolyse freigesetzt und damit petrolätherlöslich wurde. Wir fanden vor der Hydrolyse nur 2 % der gesamten Fettsäuren in freier Form.

Tabelle 3 zeigt außerdem noch die Verteilung der Radioaktivität auf Myristinsäure (C_{14}), Palmitinsäure (C_{16}) und Stearinsäure (C_{18}), wie sie die Radiogaschromatographie für beide Extrakte ergab.

Tabelle 3

Verteilung der inkorporierten Radioaktivität aus $1-^{14}C$ -Acetyl-pantethein auf freie und gebundene Fettsäuren.

	Gesamtradioaktivität	Radioaktivität der einzelnen Säuren		
		C_{14}	C_{16}	C_{18}
Extrakt A (freie Fettsäuren)	10 765 Ipm	1870 Ipm	7960 Ipm	935 Ipm
Extrakt B (freie und gebundene Fettsäuren)	522 800 Ipm	51400 Ipm	380000 Ipm	91 400 Ipm

(Exptl. Bedingungen s. S. 89 ; davon abweichend enthielt der Ansatz 104 γ Synthetase (520 mE/mg); NADPH-Verbrauch: 1,2 μ Mol).

Man muß annehmen, daß - in Analogie zur Bildung von Palmityl-CoA bei der normalen Synthese - Palmityl-pantethein Hauptprodukt der Fettsäuresynthese mit Pantethein-Derivaten ist. Wir konnten dieses Produkt nachweisen. Dazu inkubierten wir - wie oben - Synthetase mit NADPH, $1-^{14}C$ -Acetyl-pantethein und Malonyl-pantethein und beendeten die Reaktion durch Zugabe von Perchlorsäure. Aus dem säureunlöslichen Niederschlag extrahierten wir mit Chloroform/Methanol (2:1) eine radioaktive Substanz, die sich in der Dünnschichtchromatographie als identisch mit synthetischem Palmityl-pantethein erwies (Fig. 12).

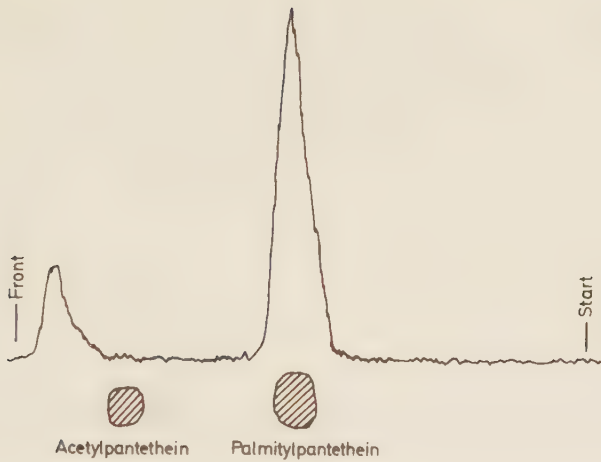


Fig. 12: Palmityl-pantethein als Endprodukt der Fettsäuresynthese mit Pantethein-Derivaten (Dünnschichtchromatographie in Chloroform/Methanol 2:1 (s. Exptl. Teil S. 91).

Der zweite Gipfel im Chromatogramm nahe der Front wurde nicht identifiziert. Er ist vermutlich nicht nur auf freie Palmitinsäure sondern auch auf Zerfallsprodukte des Palmityl-pantetheins zurückzuführen, die während der Aufarbeitung entstanden sind.

War die enzymatische Bildung von Palmityl-pantethein als Endprodukt der Synthese nachgewiesen, so sollte es auch möglich sein, den Palmityl-Transferschritt mit einer Austauschreaktion nach der Gleichung



nachzuweisen. Dieser Austausch war nach HAGEN infolge einer strengen Spezifität der Palmityltransferase für Coenzym A nicht möglich (Lit. 46). Wir konnten jedoch in einem Ansatz mit

¹⁴
1- C-Palmityl-CoA, Pantethein und Synthetase den Austausch nach obiger Gleichung feststellen, indem wir die enzymatische Bildung von 1-¹⁴C-Palmityl-pantethein wiederum dünnsschichtchromatographisch nachwiesen (Fig. 13a). Ohne Enzym fand der Austausch nicht statt (Fig. 13b).

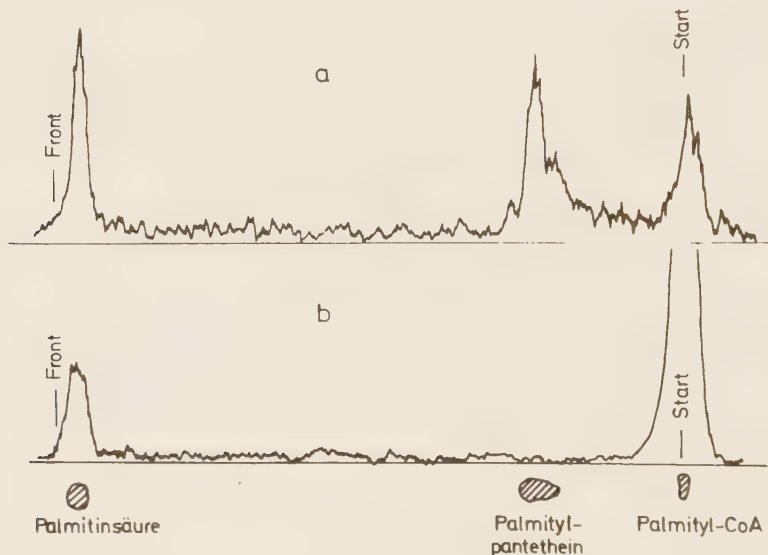


Fig. 13: Palmityl-pantethein durch Austauschreaktion (s. Text und Exptl. Teil S.91 ; Dünnschichtchromatographie in Chloroform/n-Butanol 2:1)

- a) mit Synthetase
- b) ohne Synthetase

Abschließend verglichen wir die Endprodukte einer pantetheinabhängigen und einer CoA-abhängigen enzymatischen Fettsäuresynthese. Das Radiogaschromatogramm der Endprodukte der Synthese mit Pantethein-Derivaten (Fig. 14) zeigte auch in den Einzelheiten nahezu vollkommene Übereinstimmung mit der Analyse eines entsprechenden enzymatischen Ansatzes mit CoA-Derivaten.

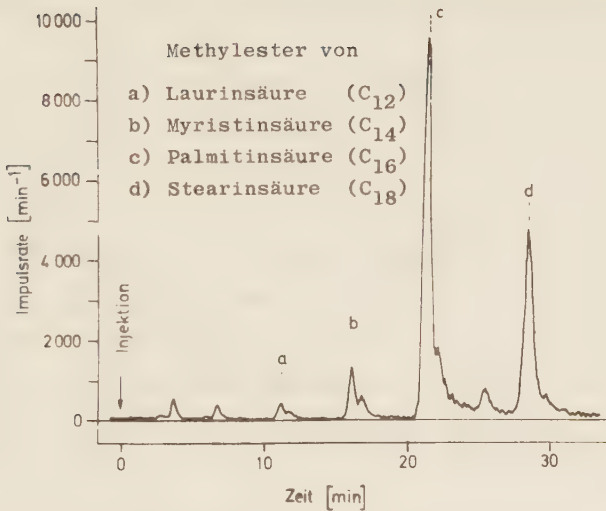


Fig. 14: Radiogaschromatogramm der Endprodukte der Fettsäuresynthese mit Pantethein-Derivaten (Säulentyp: 10 % NPGS (3m); Temperatur 175-230° mit Heizrate 4°/min (s. Exptl. Teil S. 89).

Als Ergebnis dieser Versuche können wir festhalten, daß die Synthese mit Pantethein-Derivaten keine wesentlichen Unterschiede zur Synthese mit CoA-Derivaten aufweist. Gegenüber dem Thiol-Rest der Substrate besteht anscheinend keine strenge Spezifität der Synthetase bzw. ihrer Transferasen. Statt Pantethein kann u.a. auch N-Acetyl-cysteamin das Coenzym A ersetzen, wie SUMPER (Lit. 32) zeigen konnte. In diesem Zusammenhang sei aber vermerkt, daß offenbar nur Thioester die Synthese starten können. Acetyl-CoA ließ sich nicht durch energiereiche Derivate wie Acetyl-phosphat, Acetyl-carnitin oder Acetyl-imidazol ersetzen.

2) Abhängigkeit der Fettsäuresynthese von der Kettenlänge des Starters

In der normalen Fettsäuresynthese dient Acetyl-CoA als "Starter" der ganzen Reaktionsfolge. Es kann jedoch in dieser Funktion mehr oder weniger gut durch homologe CoA-Derivate gesättigter Monocarbonsäuren ersetzt werden, wie schon frühere Arbeiten zeigten (Lit. 1). SCHWEIZER untersuchte als erster (Lit. 13) die Abhängigkeit der Synthesegeschwindigkeit von der Kettenlänge des als "Starter" benützten gesättigten Acyl-Restes. Er fand bei einer bestimmten Acyl-CoA-Konzentration neben dem erwarteten Maximum für den Acetyl-Rest (C_2) ein weiteres Maximum für den Decanoyl-Rest (C_{10}).

Wir wiederholten und erweiterten diese Untersuchungen und maßen für die geradzahligen (C_2 - C_{16}) und die ungeradzahligen (C_9 und C_{11}) Acyl-CoA-Verbindungen die Substratabhängigkeiten der fettsäuresynthetisierenden Aktivität der Synthetase im optischen Test. Die Ergebnisse sind in Figur 15, Figur 16 und Figur 17 zusammengefaßt.

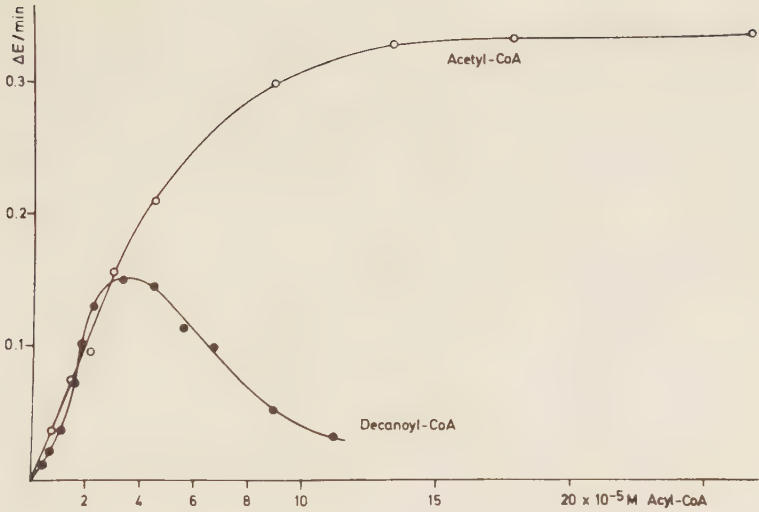


Fig. 15: Fettsäuresynthese mit Acetyl-CoA und Decanoyl-CoA als Starter (Standardansatz s. Exptl. Teil S. 92).

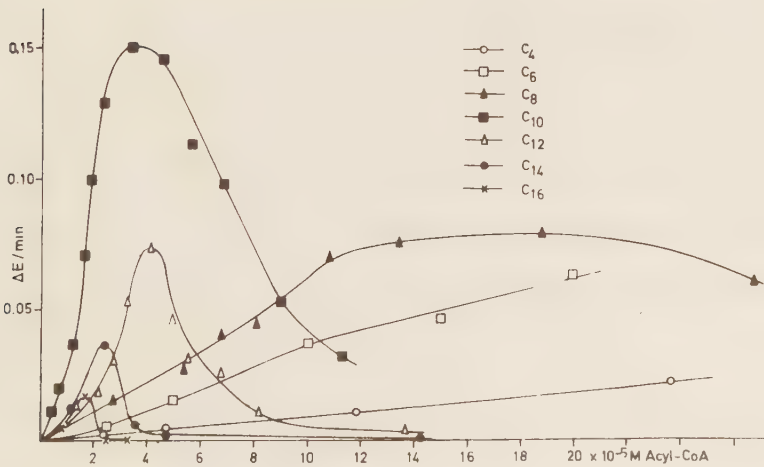


Fig. 16: Fettsäuresynthese mit verschiedenen Acyl-CoA-Derivaten (C_4 - C_{16}) als Starter (Standardansatz s. Exptl. Teil S. 92).

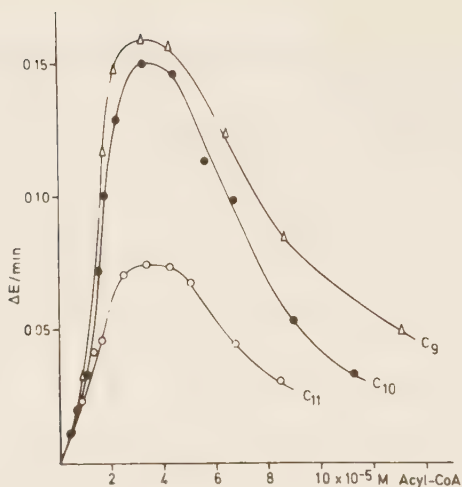


Fig. 17: Fettsäuresynthese mit verschiedenen Acyl-CoA-Derivaten (C_9 - C_{11}) als Starter (Standardansatz s. Exptl. Teil S. 92).

Besonders auffallend an diesen Kurven war die ab C_8 deutlich sichtbare und mit wachsender Kettenlänge zunehmende Substrathemmung. Sie ließe sich mit einer Konkurrenz der längeren Acyl-Reste mit dem Malonyl-Rest um die zentrale SH-Gruppe erklären. Ergebnisse von LUST und LYNEN (Lit. 31) ergaben für Lauryl-CoA (C_{12}) bis Stearyl-CoA (C_{18}) eine kompetitive Hemmung der normalen Fettsäuresynthese mit Malonyl-CoA, die auf eine derartige Konkurrenz zurückzuführen wäre. Eine andere Erklärung dieser Hemmung bestünde in einer zunehmenden Detergenswirkung der CoA-Derivate von Caprylyl-CoA (C_8) zum Palmityl-CoA (C_{16}). Wir kommen später noch auf diese Hemmung zurück (S. 37).

Auffallend hoch war, wie erwartet, die Synthesegeschwindigkeit mit Decanoyl-CoA (= Capriny-CoA), die allerdings von der mit Nonanoyl-CoA noch übertroffen wurde (Fig. 17). Dies wird in

Figur 18 besonders deutlich, wo die Synthesegeschwindigkeit bei einer bestimmten Acyl-CoA-Konzentration (30 $\mu\text{Mol/ml}$) gegen die Kettenlänge (Zahl der C-Atome) des Starters aufgetragen wurde. Wir erhielten bei 9-10 Kohlenstoffatomen ein deutliches Maximum.

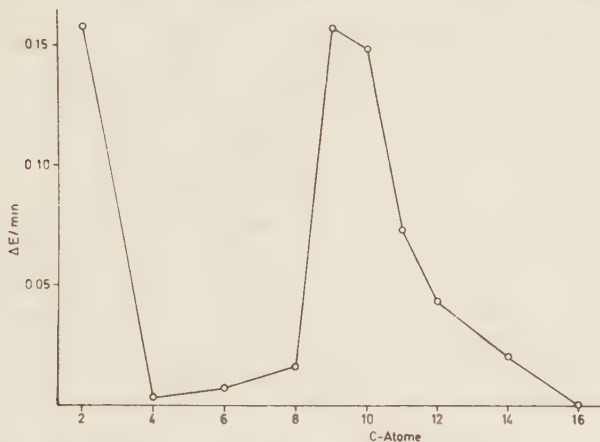


Fig. 18: Synthetaseaktivität in Abhängigkeit von der Kettenlänge des Starteracylrestes (Standardansatz Fig. 15-17; überall 30 μMol Acyl-CoA/ml).

Um zu zeigen, daß dies nicht einem Zufall zuzuschreiben ist, der in der willkürlichen Wahl einer bestimmten Acyl-CoA-Konzentration liegen könnte, trugen wir auch die gemessene Maximalgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Kettenlänge auf. Wir erhielten ein entsprechendes Maximum bei neun und zehn Kohlenstoffatomen (Fig. 19).

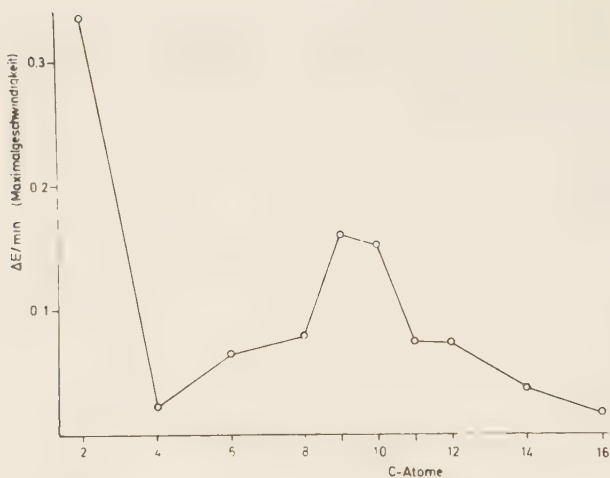


Fig. 19: Synthetaseaktivität in Abhängigkeit von der Kettenlänge des Starteracylrestes (gemessene Maximalgeschwindigkeit; s. Fig. 15-17).

Hier zeigte sich übrigens die Vorrangstellung des Acetyl-CoA als Starter besonders deutlich.

Die anderen Starter waren CoA-Derivate von Acyl-Resten, die gesättigte Zwischenstufen der Synthese darstellen. Man könnte daher im Prinzip erwarten, daß mit diesen Startern dieselbe Synthesegeschwindigkeit wie mit Acetyl-CoA erreicht wird, zumindest solange man mit niedrigen Acyl-CoA-Konzentrationen arbeitet. Denn für das kondensierende Teilenzym der Synthetase, das ja den langsamsten Schritt der Reaktionsfolge katalysiert, ist die Situation die gleiche, ob der Acyl-Rest nun direkt vom Coenzym A oder vom Enzym kommt. Für die deutlichen Unterschiede in der Synthesegeschwindigkeit mit verschiedenen Startern muß man daher die Transferschritte, die vor der Kondensation liegen, verantwortlich

machen. Denn dort kann sich der Unterschied der Starter gegenüber Acetyl-CoA auswirken. Wir betrachteten daher die Unterschiede in der Synthesegeschwindigkeit als Ausdruck der Spezifität der Acyltransferase, die die Reaktionsfolge einleitet.

Demnach könnte man Figur 18 und 19 so deuten: Neben einer Transferase, die für Acetyl-CoA ziemlich streng spezifisch ist, existiert offenbar noch eine Transferase mit Spezifität für Acyl-CoA-Verbindungen mittlerer Kettenlänge (C_9 und C_{10}). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die Synthetase nach AYLING (Lit. 34) für den Decanoyl-Rest die doppelte Anzahl nicht-thiolartiger Akzeptorstellen besitzt wie für den Palmityl-Rest. Möglicherweise gehört ein Teil dieser Akzeptorstellen zu einer "Decanoylspezifischen" Transferase. Die Funktion einer derartigen Transferase im Stoffwechsel bleibt allerdings unklar.

3) Fettsäuresynthese mit Decanoyl-CoA als Starter

Da wir die Fettsäuresynthese mit Decanoyl-CoA für spätere Versuche als Bezugspunkt wählten, versuchten wir sie noch näher zu charakterisieren.

Bemerkenswert war der Einfluß der Malonyl-CoA-Konzentration auf das Aussehen der Substratabhängigkeits-Kurve von Decanoyl-CoA (Fig. 20). Mit steigender Malonyl-CoA-Konzentration verschob sich das Maximum der Geschwindigkeit zu höheren Decanoyl-CoA-Konzentrationen. Dieses Ergebnis ließe sich durch eine Konkurrenz zwischen Decanoyl-CoA und Malonyl-CoA erklären. Auch die Abhängigkeit der Synthesegeschwindigkeit von der Malonyl-CoA-Konzentration, die Figur 21 für zwei verschiedene Decanoyl-CoA-Konzentrationen zeigt, sprach für eine solche Konkurrenz.

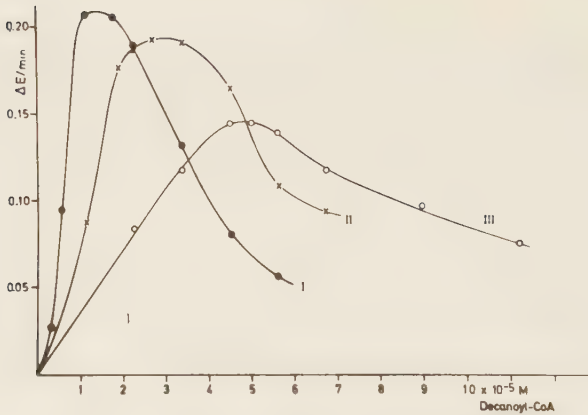


Fig. 20: Einfluß der Malonyl-CoA-Konzentration auf die Substratabhängigkeit der Fettsäuresynthese mit Decanoyl-CoA (Standard-Synthetasetest; statt Acetyl-CoA angegebene Mengen Decanoyl-CoA; 28 γ Synthetase (2050 mE/mg) Malonyl-CoA wie angegeben)

I $2,8 \times 10^{-5}$ M Malonyl-CoA
 II $5,6 \times 10^{-5}$ M Malonyl-CoA
 III $11,2 \times 10^{-5}$ M Malonyl-CoA

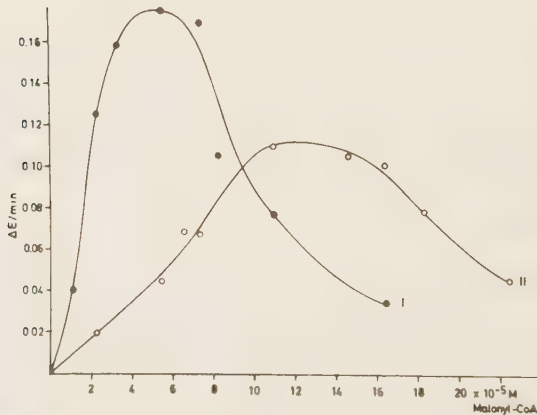


Fig. 21: Abhängigkeit der Synthesegeschwindigkeit mit Decanoyl-CoA von der Malonyl-CoA-Konzentration (Standard-Synthetasetest; statt Acetyl-CoA angegebene Mengen Decanoyl-CoA; Malonyl-CoA wie angegeben; 23,3 γ Synthetase (1960 mE/mg)

I $2,25 \times 10^{-5}$ M Decanoyl-CoA
 II $6,75 \times 10^{-5}$ M Decanoyl-CoA

Allgemein könnte man diese Konkurrenz so beschreiben: Je höher die Malonyl-CoA-Konzentration ist, desto mehr Akzeptorstellen sind mit Malonyl-Resten besetzt, die ebenfalls von Decanoyl-Resten besetzt werden können. Die überwiegende Besetzung dieser Stellen mit dem Acyl-Rest des einen Substrates bringt ein Absinken der Reaktionsgeschwindigkeit mit sich infolge des Mangels an reaktionsfähigen Acylresten des anderen Substrates. Ob es sich bei diesen Stellen etwa um Akzeptorstellen der Transferasen oder aber um die zentrale SH-Gruppe der Synthetase handelt, ließ sich anhand dieser Experimente nicht entscheiden. Zwar erscheint eine Konkurrenz um die zentrale SH-Gruppe wahrscheinlicher, da sie auch anderweitig beobachtet wurde (s. oben S. 32 und Lit. 39), doch kann man die andere Möglichkeit in diesem Fall nicht ausschließen. Genaueren Aufschluß über den Ort, an dem sich diese Konkurrenz abspielt, würden Beladungsversuche mit der Synthetase ergeben können.

Die Detergenswirkung als Erklärung für die Substrathemmung (s. oben S. 32) erscheint angesichts des beschriebenen Malonyl-CoA-Effektes nicht sehr überzeugend (s. auch S. 46 und 53).

Um sicher zu stellen, daß die Fettsäuresynthese mit Decanoyl-CoA zu den normalen Endprodukten führte, analysierten wir die aus 1-¹⁴C-Decanoyl-CoA, Malonyl-CoA und NADPH gebildeten Fettsäuren (Fig. 22). Wir fanden als Hauptprodukt Stearinsäure neben etwas Palmitinsäure und unveränderter Decansäure. Das Überwiegen der C₁₈-Säure gegenüber der C₁₆-Säure erklärt sich aus der begrenzten Menge Decanoyl-CoA dieses Versuches (s. Exptl. Teil S. 92).

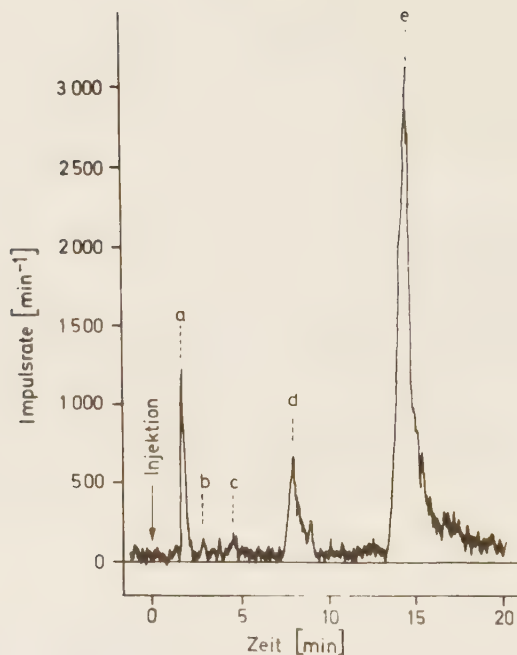


Fig. 22: Endprodukte der Fettsäuresynthese mit Decanoyl-CoA (Radiogaschromatogramm; Säulentyp: 15 % PEGS (2m), Temperatur 175°)
Einzelheiten s. Exptl. Teil S. 92.

Methylester von	a) Caprinsäure
	b) Laurinsäure
	c) Myristinsäure
	d) Palmitinsäure
	e) Stearinsäure

4) 3-Hydroxydecanoyl-CoA und 2-Decenoyl-CoA als Starter der Fettsäuresynthese

Bisher war es unmöglich gewesen, mit den CoA-Derivaten der nicht-gesättigten Zwischenstufen, wie β -Ketosäuren, β -Hydroxysäuren oder α,β -ungesättigten Säuren (s. Schema S. 2), die Fettsäuresynthese zu starten (Lit. 35,36). Dies wurde schon früher mit einer Spezifität der Acyltransferase für gesättigte Acyl-Reste begründet (Lit. 31).

Wir setzten nun die CoA-Derivate von 3-Hydroxydecanensäure und 2-Decensäure ein, deren Acyl-Rest zehn C-Atome besaß. Wir wußten, daß der gesättigte Decanoyl-Rest rasch auf das Enzym übertragen wurde. Die Aussicht, auch eine Übertragung der entsprechenden nicht-gesättigten Acyl-Reste feststellen zu können, erschien uns daher besonders groß.

Die ersten Versuche, die Fettsäuresynthese mit 3-Hydroxydecanoyl-CoA und 2-Decenoyl-CoA zu starten, schienen erfolglos. Im optischen Test fanden wir unter den üblichen Bedingungen praktisch keine Aktivität. Erst eine Erhöhung der Enzymmenge um das 10-20fache mit gleichzeitiger Verlängerung der Vorinkubationszeit mit NADPH ohne Malonyl-CoA führte bei Malonyl-CoA-Zusatz zu einem raschen NADPH-Verbrauch bis zu einem bestimmten Endwert. Dieser NADPH-Verbrauch war abhängig von der Vorinkubationszeit, wie Figur 23 für 3-Hydroxydecanoyl-CoA zeigt.

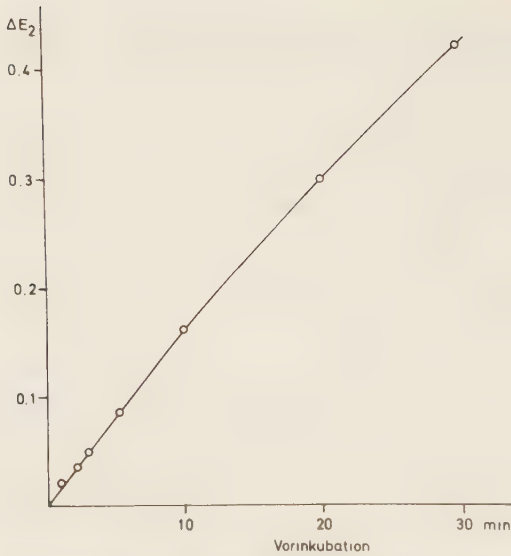


Fig. 23: Abhängigkeit des NADPH-Verbrauchs von der Vorinkubationszeit (Einzelheiten s. Exptl. Teil S.94).

Eine entsprechende Zeitabhängigkeit fanden wir auch bei 2-Decenoyl-CoA. Figur 24 gibt schematisch das Bild eines derartigen optischen Testes wieder, wobei ΔE_2 den beschriebenen zeitabhängigen NADPH-Verbrauch darstellt.

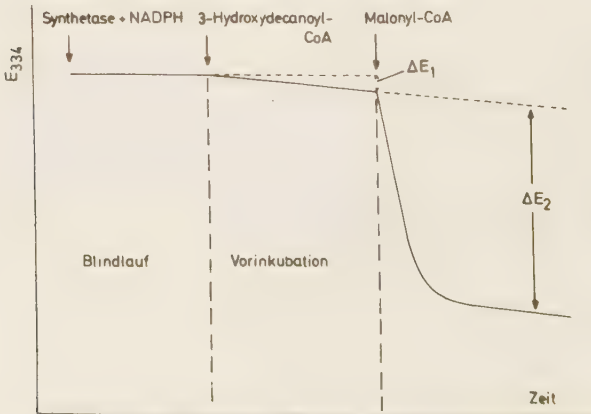


Fig. 24: Schema eines optischen Testes der Fettsäuresynthese mit 3-Hydroxydecanoyl-CoA

Ein Verbrauch an NADPH während der Vorinkubationszeit (ΔE_1) konnte nur in einer besonderen Anordnung gemessen werden. Dazu benötigte man einerseits noch mehr Enzym, andererseits mußte der Blindlauf durch NADPH-Oxidation mittels Vergleichsküvette ausgeschaltet werden.

Diese Beobachtungen erklärten wir folgendermaßen: Der 3-Hydroxydecanoyl- bzw. 2-Decenoyl-Rest wird langsam von der Synthetase unter geringem NADPH-Verbrauch zum gesättigten Decanoyl-Rest umgewandelt (ΔE_1). Dieser kann dann bei Malonyl-CoA-Zugabe sehr rasch vollständig zu höheren Fettsäuren umgewandelt werden. Der dabei gemessene NADPH-Verbrauch zeigte, daß die gebildete Menge an Decanoyl-Resten größer war, als sie bei einem stöchiometrischen Umsatz mit der Synthetase hätten sein können. Wir müssen daher eine Umwandlung von 3-Hydroxydecanoyl-CoA bzw. 2-Decenoyl-CoA zu Decanoyl-CoA annehmen, bei der der Synthetase offenbar eine echte katalytische Funktion zukommt. Mit zunehmender Vorinkubationszeit wird mehr Decanoyl-CoA gebildet und ΔE_2 wächst dadurch entsprechend (Fig. 23).

Die für diese Umwandlung denkbaren zwei Wege sind in Figur 25 schematisch für das 3-Hydroxyacyl-Derivat wiedergegeben.

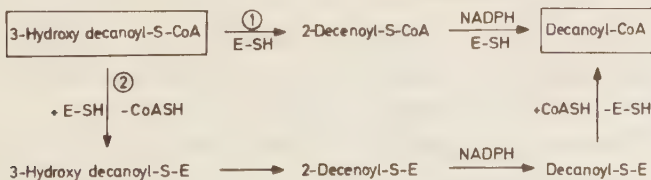


Fig. 25: Mögliche Wege der Umwandlung von 3-Hydroxydecanoyl-CoA zu Decanoyl-CoA

Einmal könnte 3-Hydroxydecanoyl-CoA sich wie ein Modellsubstrat verhalten, etwa den N-Acetylcysteamin-Derivaten entsprechend. Wie diese würde es in lockerer nicht-kovalenter Bindung (Lit. 37) langsam vom Enzym zu Decanoyl-CoA umgesetzt (Weg 1). Bei der zweiten Möglichkeit (Weg 2) stünde am Anfang eine langsame geschwindigkeitsbestimmende Übertragung des 3-Hydroxydecanoyl-Restes von CoA auf das Enzym. Nach dieser Transferreaktion würde der Acyl-Rest, kovalent an der "zentralen" SH-Gruppe gebunden, rasch zur α,β -ungesättigten Verbindung dehydratisiert und mit NADPH zum Decanoyl-Rest reduziert. Abschließend fände eine Rückübertragung des Decanoyl-Restes auf Coenzym A statt.

Um zwischen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, untersuchten wir, ob die Umwandlung von 3-Hydroxydecanoyl-CoA zum Decanoyl-CoA auch mit NÄM-gehemmter Synthetase möglich war. In einer Konzentration von 10^{-2} M hemmt NÄM die Gesamtreaktion der Synthetase durch Blockierung der SH-Gruppen, sowohl der "zentralen" wie der "peripheren" (Lit. 12). Da für die Übertragung und Umwandlung des 3-Hydroxydecanoyl-Restes nach Weg 2 jedoch die "zentrale" SH-Gruppe benötigt wird, kann man bei Verwendung von NÄM-gehemmter Synthetase keine Umwandlung zu Decanoyl-CoA erwarten. Nach Weg 1 wäre diese Umwandlung jedoch noch möglich, da NÄM unter diesen Bedingungen die einzelnen Teilschritte der Synthese, wie Dehydratisierung und 2. Reduktion, nicht hemmt (Lit. 38).

Bei den Versuchen (Einzelheiten s. Exptl. Teil S.96) inkubierten wir zunächst NÄM-gehemmte Synthetase mit 3-Hydroxydecanoyl-CoA und NADPH allein. Um das Decanoyl-CoA nachweisen zu können, das möglicherweise bei der Inkubation (nach Weg 1 in Fig. 25) entstanden war, setzten wir nicht-gehemmte Synthetase zu. Bei

Zugabe von Malonyl-CoA würde sich dann durch den NADPH-Verbrauch (ΔE_2) die gebildete Menge an Decanoyl-CoA bestimmen lassen. Setzten wir unmittelbar nach Zugabe von nicht-gehemmter Synthetase Malonyl-CoA hinzu, so fanden wir kaum einen NADPH-Verbrauch. Wurde Malonyl-CoA erst nach einer weiteren Vorinkubationszeit zugesetzt, so wurde zwar NADPH verbraucht, aber dieser NADPH-Verbrauch entsprach dem Wert, der auch ohne NAM-gehemmte Synthetase gemessen wurde (Fig. 26).

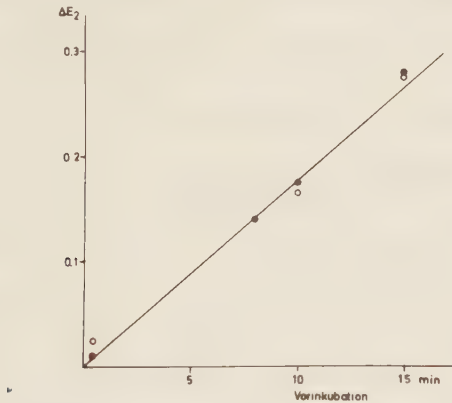


Fig. 26: Zeitabhängigkeit des NADPH-Verbrauches (ΔE_2 ; vgl. Fig. 23 und 24) mit (—○—) und ohne (—●—) zusätzliche NAM-gehemmte Synthetase (Einzelheiten s. Text und Exptl. Teil S. 96).

Man ersieht daraus, daß eine NAM-gehemmte Synthetase keinen Einfluß hat, also offensichtlich die Umwandlung von 3-Hydroxydecanoyl-CoA zu Decanoyl-CoA nicht zu katalysieren vermag. Dieses Ergebnis sprach für die oben erläuterte zweite Möglichkeit (Weg 2, Fig. 25), bei der eine Übertragung des Acyl-Restes vom CoA auf das Enzym gefordert wurde.

Dies bedeutete andererseits auch, daß die einleitende Transferreaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der ganzen Umwandlung darstellte. Denn Dehydratisierung und 2. Reduktion waren rasche Reaktionen der normalen Synthese, und auch die Übertragung des Decanoyl-Restes vom Enzym auf CoA sollte nach SCHWEIZER (Lit. 13) ähnlich rasch verlaufen wie bei einem Palmityl-Rest.

Für die Umwandlungsgeschwindigkeit war ΔE_1 ein direktes Maß. Dieser NADPH-Verbrauch, verursacht durch die 2. Reduktion, konnte wie schon erwähnt (S. 41), mit viel Enzym gemessen werden. Aus dem NADPH-Verbrauch ΔE_1 konnte man die gebildete Menge an Decanoyl-CoA berechnen und damit vorhersagen, wie groß der NADPH-Verbrauch bei Malonyl-CoA-Zugabe während der Fettsäuresynthese (ΔE_2) theoretisch sein sollte. Wir fanden eine hinreichend gute Übereinstimmung der gemessenen und berechneten Werte (z.B. ΔE_2 (theor.): 0,14; ΔE_2 (ber.): 0,16 (s. auch Exptl. Teil S. 94)). Demnach war ΔE_2 bei Berücksichtigung der Vorinkubationszeit ein indirektes Maß für die Geschwindigkeit der Fettsäuresynthese.

Figur 27 zeigt einen Vergleich zwischen 3-Hydroxydecanoyl-CoA und 2-Decenoyl-CoA in ihrer Fähigkeit, die Fettsäuresynthese zu starten. Als Maß diente ΔE_2 nach 10 Min. Vorinkubation. Im Sättigungsbereich beider CoA-Derivate wurde offenbar mit 2-Decenoyl-CoA etwa doppelt so viel Decanoyl-CoA gebildet wie mit 3-Hydroxydecanoyl-CoA. Entsprach das wirklich einer doppelt so raschen Übertragung des 2-Decenoyl-Restes auf das Enzym wie des 3-Hydroxydecanoyl-Restes? Diese Frage stellte sich deshalb, weil

das Gemisch der D- und L-Form der β -Hydroxyverbindung benutzt wurde. Bekanntlich wird bei der Fettsäure-Synthese nur die D-Form der β -Hydroxyverbindungen umgesetzt (Lit. 1). Falls die inaktive L-Form in unserem Versuch gerade die Hälfte des eingesetzten Enzyms hemmt, würde man auch das Ergebnis von Figur 27 erhalten. Die Transfargeschwindigkeiten wären dann aber für beide Acyl-Reste gleich groß. Um diese Frage zu entscheiden, müßten Versuche mit den reinen optischen Isomeren unternommen werden.

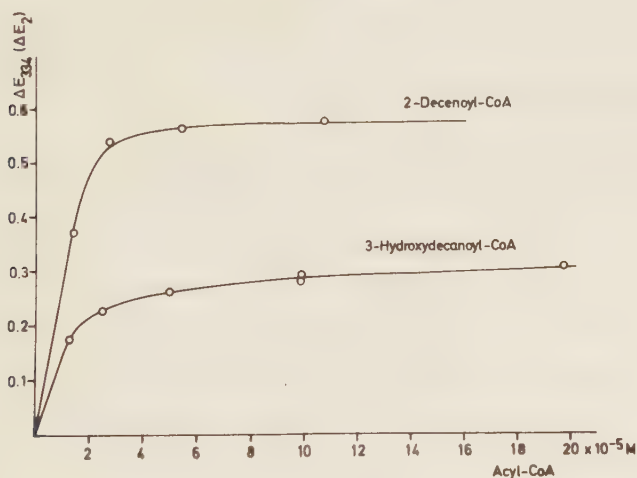


Fig. 27: Vergleich zwischen 3-Hydroxydecanoyl-CoA und 2-Decenoyl-CoA (Einzelheiten s. Text und Exptl. Teil S. 95).

Bei Figur 27 fällt übrigens auf, daß 2-Decenoyl-CoA auch bei hohen Konzentrationen das Enzym offenbar nicht hemmt. Bei Decanoyl-CoA hatten wir bei vergleichbaren Konzentrationen

($10^{-4}M$) bereits starke Hemmung beobachtet (s. Fig. 16). Nimmt man an, daß sich Decanoyl-CoA und 2-Decenoyl-CoA als Detergentien ähnlich verhalten, so scheidet damit eine unspezifische Detergenswirkung als Erklärung für die Substrathemmung bei Decanoyl-CoA aus. Dagegen gewinnt die Erklärung durch Konkurrenz zwischen Malonyl- und Decanoyl-Resten, wie sie bereits erörtert wurde (s. S. 35), an Wahrscheinlichkeit.

Verglichen mit Decanoyl-CoA ist die Synthesegeschwindigkeit mit 3-Hydroxydecanoyl-CoA und 2-Decenoyl-CoA sehr gering. Aus den Werten der Figur 27 errechneten wir für 3-Hydroxydecanoyl-CoA 2 %, für 2-Decenoyl-CoA 4 % der maximalen Geschwindigkeit, die mit Decanoyl-CoA erreicht wurde.

War diese niedrige Transfergeschwindigkeit der Grund dafür, daß die Fettsäuresynthese in früheren Versuchen nur mit den gesättigten Acyl-CoA-Verbindungen und nicht mit den CoA-Derivaten der Zwischenstufen gestartet werden konnte? Bei diesen Versuchen waren C_4 -Derivate (Acetoacetyl-CoA und β -Hydroxybutyryl-CoA) und C_8 -Derivate (2-Octenoyl-CoA) eingesetzt worden (Lit. 31). Nun waren aber bei diesen Kettenlängen die Startereigenschaften der entsprechenden gesättigten Verbindungen (Butyryl-CoA (C_4) und Caprylyl-CoA (C_8)) schon sehr schlecht (s. S. 33, Fig. 18). Daher waren wir zunächst geneigt, die obige Frage zu bejahen. Andererseits besteht aber die Möglichkeit, daß die von uns beobachtete Starterfunktion von CoA-Derivaten der nicht-gesättigten Zwischenstufen auf die C_{10} -Derivate beschränkt ist, weil im Enzymkomplex eine spezifische Transferase für Acyl-Reste dieser Kettenlänge enthalten ist (s.S. 35). Für diese Erklärung sprach

die Beobachtung, daß 3-Hydroxypropionyl-CoA die Synthese nicht starten konnte, obgleich sich die zugehörige gesättigte Verbindung, Propionyl-CoA, als guter Starter erwies.

Die bisher dargelegten Vorstellungen stützten sich zunächst nur auf den gemessenen NADPH-Verbrauch in verschiedenen optischen Testen. Die Analyse der Endprodukte dieser Synthesen bestätigte jedoch die Hypothese, daß gesättigte Fettsäuren gebildet werden. Bei Einsatz von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA erhielten wir mit β -Hydroxydecanoyl-CoA und 2-Decenoyl-CoA (s. Exptl. Teil S. 96) radioaktive Fettsäuren, deren radiogaschromatographische Analyse Figur 28 zeigt. Mit beiden CoA-Derivaten wurden wie erwartet die gesättigten Fettsäuren ($\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$) gebildet. Eine direkte Verlängerung des 3-Hydroxy-Acyl-Restes oder des α,β -ungesättigten Säurerestes unter Erhalt der funktionellen Gruppe fand offenbar nicht statt.

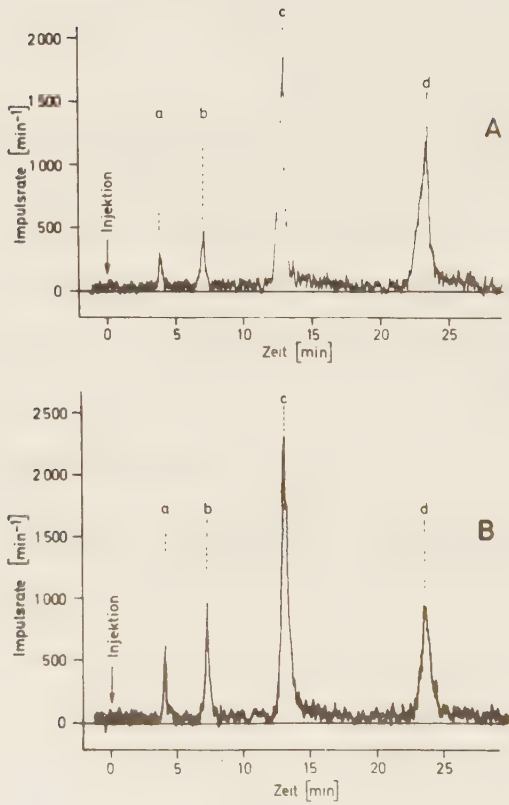


Fig. 28: Endprodukte der Fettsäuresynthese mit 3-Hydroxydecanoyl-CoA (A) und 2-Decenoyl-CoA (B)
(Radiogaschromatogramm; Säulentyp: 16 % SE 30 (2m), Temperatur 225°; Einzelheiten s. Exptl. Teil S. 96)
Methylester von a) Laurinsäure, b) Myristinsäure, c) Palmitinsäure, d) Stearinsäure.

5. Start der Fettsäuresynthese mit "unnatürlichen" CoA-Derivaten

Bisher hatten wir als Starter CoA-Derivate von Säuren eingesetzt, die Zwischenstufen der normalen Fettsäuresynthese darstellen. Als "unnatürlich" bezeichnen wir solche CoA-Derivate, deren Säurereste nicht intermediär in der Fettsäuresynthese auftreten. Versuche, mit solchen Derivaten die Fettsäuresynthese zu starten, werden in diesem Abschnitt beschrieben.

Da Decanoyl-CoA ein guter Starter der Synthese war, verwendeten wir auch hier CoA-Derivate, deren Acyl-Rest zehn Kohlenstoffatome besaß. Die Acyl-Reste trugen nun aber in ganz verschiedenen Positionen funktionelle Gruppen. Da diese Gruppen in der betreffenden Position für den ganzen Enzymkomplex "unbekannt" waren, konnte man den Einfluß der Acyl-Reste auf Teilaktivitäten aus der gemessenen Gesamtaktivität nicht abschätzen. Wir maßen für alle Derivate die Substratabhängigkeiten der fettsäuresynthetisierenden Aktivität des Komplexes und analysierten in einigen Fällen die Endprodukte der enzymatischen Synthese.

a) 4-Ketodecanoyl-CoA und 7-Ketodecanoyl-CoA

4-Ketodecanoyl-CoA ist ein γ -Ketosäure-Derivat. Es war interessant zu erfahren, ob die Synthetase die Ketogruppe wie beim "natürlichen" β -Ketosäure-Rest reduzieren und umwandeln würde bis zur Bildung eines gesättigten Acyl-Restes. Wenn das der Fall wäre, würde man wie bei 3-Hydroxydecanoyl-CoA und 2-Decenoyl-CoA beschrieben (S.39), eine Abhängigkeit des NADPH-Verbrauches von der Vorinkubationszeit erwarten können. Eine derartige Abhängigkeit fanden wir nicht. Vielmehr begann offenbar mit 4-Ketodecanoyl-CoA als Starter unmittelbar nach Zusatz

von Malonyl-CoA die Fettsäuresynthese. Aus Figur 29 (Kurve I) ersieht man die Fähigkeit von 4-Ketodecanoyl-CoA zum Start der Synthese im Vergleich zu Decanoyl-CoA (Kurve III).

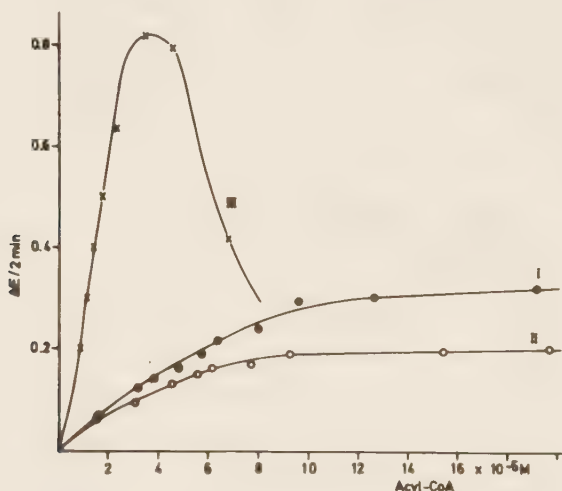


Fig. 29: Fettsäuresynthese mit 4-Ketodecanoyl-CoA (I), 7-Ketodecanoyl-CoA (II) und Decanoyl-CoA (III) als Starter (Substratabhängigkeit) (Standard-Synthetasetest; statt Acetyl-CoA angegebene Mengen Acyl-CoA; 105 γ Synthetase (1280 mE/mg)).

Mit 7-Ketodecanoyl-CoA war die erreichte Synthesegeschwindigkeit (Kurve II) zwar etwas niedriger, aber prinzipiell schien die verschiedene Position der Ketogruppe von untergeordneter Bedeutung zu sein. Die aus Figur 30 ermittelten Michaeliskonstanten (Tabelle 4) ergaben ebenfalls keine bedeutenden Unterschiede in der Affinität der beiden Substrate zum Enzym. Diese war mit der Affinität des Decanoyl-CoA vergleichbar. Dagegen bestand in der berechneten Maximalgeschwindigkeit ($V_{\max}$ aus Fig. 30)

ein deutlicher Unterschied zwischen den Keto-Derivaten einerseits und Decanoyl-CoA andererseits.

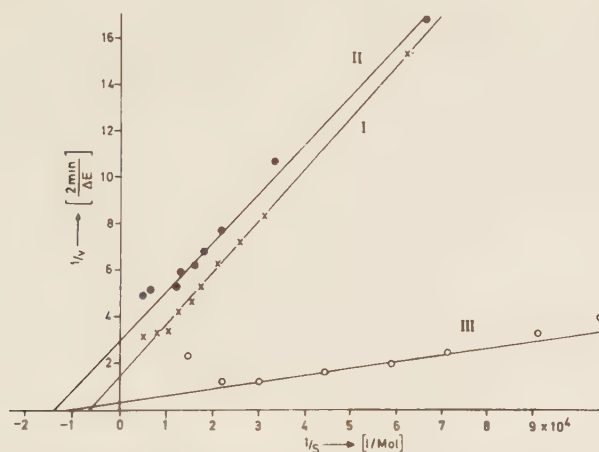


Fig. 30: Substratabhängigkeit der Fettsäuresynthese (Fig. 29) nach Lineweaver-Burk

- I 4-Ketodecanoyl-CoA
- II 7-Ketodecanoyl-CoA
- III Decanoyl-CoA

Tabelle 4

	K_M	$V_{\max}$ ($\Delta E/2\text{min}$)
4-Ketodecanoyl-CoA	$1,6 \times 10^{-4} \text{ M}$	0,67
7-Ketodecanoyl-CoA	$7,1 \times 10^{-5} \text{ M}$	0,35
Decanoyl-CoA	$9,1 \times 10^{-5} \text{ M}$	2,5

b) 3-Decenoyl-CoA und 9-Decenoyl-CoA

3-Decenoyl-CoA, ein β,γ -ungesättigtes Acyl-Derivat, verhielt sich als Starter wie das 4-Ketodecanoyl-CoA (s. oben). Es unterschied sich damit eindeutig vom α,β -ungesättigten CoA-Derivat (2-Decenoyl-CoA; s. S. 39). Die Startereigenschaft des 3-Decenoyl-CoA ergibt sich aus Figur 31 (Kurve I) im Vergleich zu Decanoyl-CoA (Kurve III).

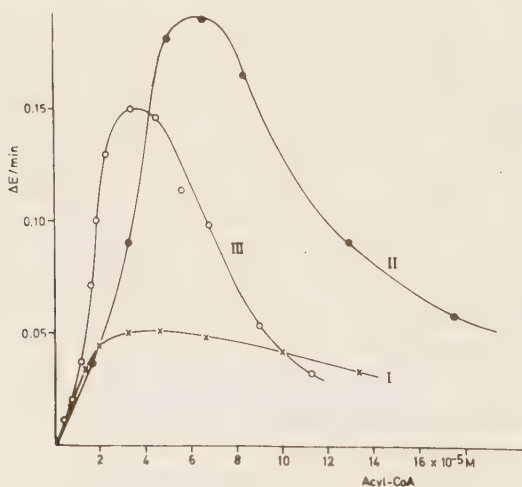


Fig. 31: Fettsäuresynthese mit 3-Decenoyl-CoA (I), 9-Decenoyl-CoA (II) und Decanoyl-CoA (III) (Substratabhängigkeit) (Standardtest s. S. 92).

9-Decenoyl-CoA mit endständiger Doppelbindung unterschied sich klar (Kurve II) von 3-Decenoyl-CoA. Mit diesem Starter wurde sogar die Maximalgeschwindigkeit mit Decanoyl-CoA (Kurve III) noch deutlich übertroffen. Offenbar störte die Doppelbindung nur, solange sie sich nahe genug am Carboxylende des Acyl-Restes befand. Die endständige Doppelbindung hingegen brachte

noch einen Vorteil verglichen mit dem gesättigten Acyl-Rest.

Die Substrathemmung ist beim 3-Decenoyl-CoA im Gegensatz zu den beiden anderen Derivaten (Fig. 31) nur schwach ausgeprägt. Beim 2-Decenoyl-CoA hatten wir überhaupt keine Hemmung feststellen können (s.S. 45). Diese deutlichen Unterschiede in der Hemmwirkung beruhen wohl kaum auf einer unterschiedlichen Detergenswirkung der Substrate; denn die Stellung einer Doppelbindung dürfte die Detergenseigenschaften nicht so stark beeinflussen. Die Erklärung für die Substrathemmung wird damit wohl tatsächlich in einer Konkurrenz zwischen den C_{10} -Resten und den Malonyl-Resten zu suchen sein, wie wir sie bereits erörtert haben (s. S. 35).

c) Weitere CoA-Derivate

Eine endständige Doppelbindung beeinträchtigt offensichtlich nicht die Fähigkeit des CoA-Derivates, die Synthese zu starten. Würde nun die Einführung endständiger hydrophiler Gruppen ebenfalls gute, mit Decanoyl-CoA vergleichbare Starter ergeben?

Für eine endständige Hydroxy-Gruppe war dies nicht der Fall, wie 10-Hydroxydecanoyl-CoA (Fig. 32, Kurve III) zeigte. Dieses Derivat war sogar ein ausgesprochen schlechter Starter. Auch eine Estergruppe in Endstellung führte zu sehr schlechten Startereigenschaften, wie das CoA-Derivat von Sebacinsäuremonomethylester (Fig. 32, Kurve II) ergab. Da dieses Derivat in seiner Kettenlänge mehr einem C_{12} -Derivat entsprach, setzten wir auch das CoA-Derivat des um 2 C-Atome kürzeren Korksäuremonomethylesters ein (Fig. 32, Kurve I). Aber auch diese Verbindung war ein schlechter Starter.

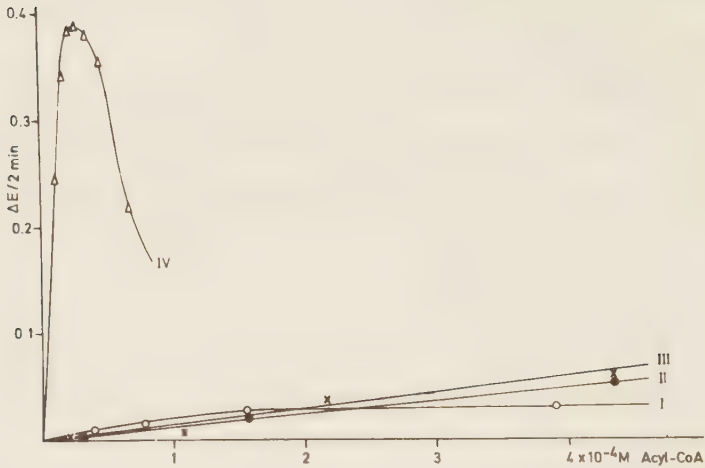


Fig. 32: Substratabhängigkeit der Fettsäuresynthese mit CoA-Derivaten von

- I Korksäuremonomethylester
- II Sebacinsäuremonomethylester
- III 10-Hydroxydekansäure
- IV Decansäure

(Standard-Synthetasetest; statt Acetyl-CoA angegebene Mengen Acyl-CoA; 32 γ Synthetase (2140 mE/mg); 0,12 μMol Malonyl-CoA)

Abschließend seien zum Vergleich in Tabelle 5 die gemessenen Maximalgeschwindigkeiten, die in der Fettsäuresynthese mit den untersuchten Startern erreicht wurden, zusammengefaßt. Dabei wurde die Maximalgeschwindigkeit mit Decanoyl-CoA als Bezugspunkt gewählt (100 %).

Tabelle 5

CoA-Derivate von	%
Decansäure	100
4-Ketodecansäure	40
7-Ketodecansäure	24
3-Decensäure	34
9-Decensäure	127
10-Hydroxydecansäure	8
Korksäuremonomethylester	15
Sebacinsäuremonomethylester	13
DL-3-Hydroxydecansäure	2
2-Decensäure	4

d) Endproduktanalysen

Zuletzt galt es noch zu prüfen, ob die funktionellen Gruppen der Acyl-Reste bei der Fettsäuresynthese erhalten blieben. Dies sollte durch radiogaschromatographische Analyse der Endprodukte, die bei Verwendung von radioaktivem Malonyl-CoA⁺) anfielen, geklärt werden.

Mit 3-Decenoyl-CoA als Starter sollten bei Erhalt der Doppelbindung ungesättigte Säuren, zur Hauptsache Palmitoleinsäure (C_{16:1}) und Vaccensäure (C_{18:1}), gebildet werden. Die Bestätigung brach-

+) Man beachte, daß das Radioaktivitätsverhältnis der gebildeten Säuren C₁₂-C₁₈ nicht dem Massenverhältnis der gebildeten Endprodukte entspricht, da von der C₁₀-Säure ausgehend die C₁₂-Säure nur eine radioaktive C₂-Einheit, die C₁₈-Säure aber vier C₂-Einheiten aus Malonyl-CoA enthält.

te die Analyse der gebildeten Fettsäuren (Fig. 33 B). Nach katalytischer Hydrierung der Fettsäuremethylester wurde im wesentlichen Palmitin- und Stearinsäure gefunden (Fig. 33 C). Wurde der Ansatz mit Kaliumpermanganat oxidiert, so konnte radioaktive Undecandicarbonsäure^{*)} einwandfrei nachgewiesen werden. Dies bedeutete, daß die Lage der Doppelbindung bei der Kettenverlängerung erhalten blieb.

Ein ganz anderes Bild erhielten wir, wenn wir vor Zugabe von Malonyl-CoA 3-Decenoyl-CoA mit Synthetase und NADPH allein vorinkubierten. Figur 34 B zeigt die Analyse der Fettsäuren, die nach 2-stündiger Vorinkubation entstanden, im Vergleich zum Chromatogramm der ohne Vorinkubation gebildeten Fettsäuren (Fig. 34 A). Neben den ungesättigten Säuren, die aus 3-Decenoyl-CoA direkt gebildet wurden, fanden wir nach Vorinkubation fast genau so viel gesättigte Säuren (Palmitin- und Stearinsäure). Wir nahmen an, daß während der Vorinkubationszeit etwa die Hälfte des 3-Decenoyl-CoA zum Decanoyl-CoA reduziert worden war. Offenbar lief diese Reduktion aber nur langsam ab (s. S. 64), so daß sie mit der Kettenverlängerung nicht konkurrieren konnte (A). Erst bei genügend langer Vorinkubation ohne Malonyl-CoA wurde sie deutlich sichtbar (B).

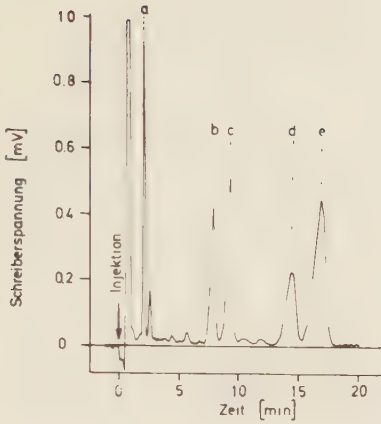
Die Frage, ob zu dieser Reduktion die Übertragung des Säurerestes auf die Synthetase nötig war (s. S. 42), wurde noch nicht untersucht (s. aber S. 64). Auch ist noch nicht geklärt, wie diese Reduktion im einzelnen abläuft. Die Doppelbindung könnte direkt reduziert werden, vermutlich vom Teilenzym der 2. Reduktion. Man kann aber auch eine vorherige Isomerisierung der Doppelbindung

^{*)} Oxidative Spaltung von Vaccensäure ergibt Önanthsäure (C₇) und Undecandicarbonsäure (C₁₁).

Fig. 33:

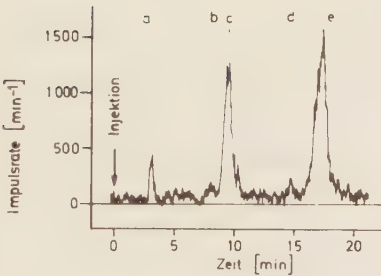
Endprodukte der Fettsäuresynthese mit 3-Decenoyl-CoA als Starter

(Gaschromatographische Analyse; Säulentyp 15 % PEGS (2m); Temperatur 175°; s. Exptl. Teil S.101)



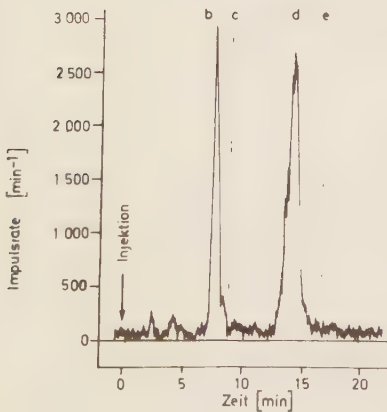
A

- A Massendendiagramm der Methylester von
- a) 3-Decensäure
 - b) Palmitinsäure ($C_{16:0}$)
 - c) Palmitoleinsäure ($C_{16:1}$)
 - d) Stearinsäure ($C_{18:0}$)
 - e) Vaccensäure ($C_{18:1}$)



B

- B Radiogaschromatogramm der Endprodukte



C

- C Radiogaschromatogramm der Endprodukte nach katalytischer Hydrierung

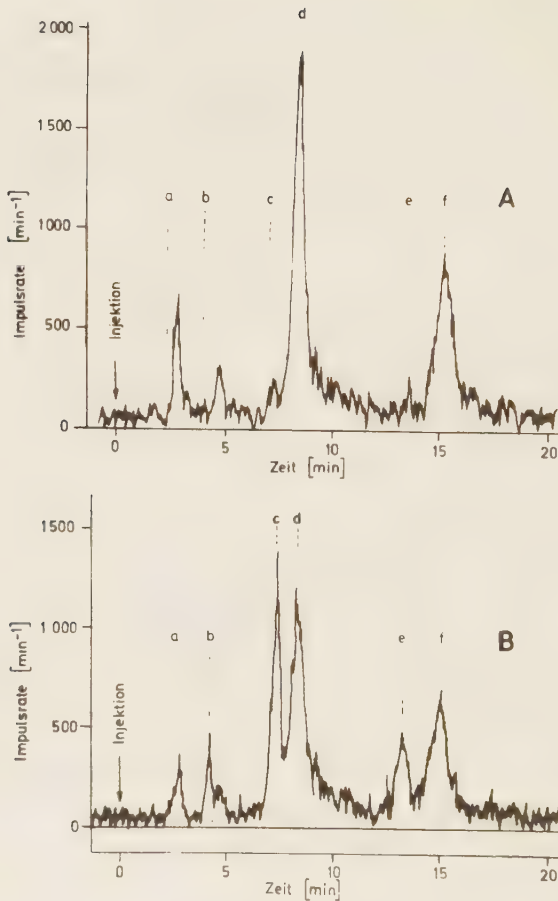


Fig. 34: Endprodukte der Fettsäuresynthese mit 3-Decenoyl-CoA als Starter

(Radiogaschromatogramm; Säulentyp 15 % PEGS (2m); Temperatur 175°; Einzelheiten s. Exptl. Teil S.102)

A Malonyl-CoA-Zusatz sofort

B Malonyl-CoA-Zusatz nach 2 h Vorinkubation

Methylester von a) Laurinsäure, b) Myristinsäure, c) Palmitinsäure, d) Palmitoleinsäure, e) Stearinsäure, f) Vaccensäure

annehmen. Diese Isomerisierung vom β,γ -ungesättigten zum α,β -ungesättigten Derivat könnte im Prinzip direkt erfolgen (vgl. Lit 72) oder auf dem Umweg über eine Hydratisierung der Doppelbindung (vgl. Lit 73).

Aus 4-Ketodecanoyl-CoA entstanden in der Synthese offensichtlich höhere Fettsäuren, die noch eine Ketogruppe enthielten. Dies wurde, wenn auch nicht unmittelbar, aus Figur 35 A entnommen. Die genaue Identifizierung der gebildeten radioaktiven Fettsäuren war allerdings nicht möglich, da die entsprechenden höheren Ketosäuren als Referenzsubstanzen nicht zur Verfügung standen. Wir begnügten uns daher damit, die Retentionszeiten der radioaktiven Säuren im Vergleich zu denen der gesättigten Säuren zu bestimmen. Logarithmisch gegen die Zahl der C-Atome aufgetragen (Fig. 36) ergaben diese Retentionszeiten eine Gerade (nahezu parallel zu der Geraden für die gesättigten Säuren), die auch die 4-Ketodecansäure mit einschloß. Daher lag es nahe, in den radioaktiven Säuren höhere Ketosäuren zu vermuten. Demnach entsprach das Hauptprodukt, nahe der Retentionszeit einer gesättigten C_{20} -Säure, einer C_{18} -Ketosäure^{*)}.

Wenn auch bei 4-Ketodecanoyl-CoA eine Vorinkubation vor Malonyl-CoA-Zugabe stattfand, änderte sich das Bild deutlich (Fig. 35 B). Neben den schon bekannten Radioaktivitätsgipfeln fanden sich weitere Radioaktivitätsgipfel, in denen wir Hydroxysäuren vermuteten^{*)}. Die Analyse dieses Ansatzes nach Trimethylsilierung der Methylester bestätigte diese Vermutung. Nur die Retentions-

*) Man beachte hier und in den folgenden Chromatogrammen vor allem die entsprechenden Radioaktivitätsgipfel (4,4' oder 4a).

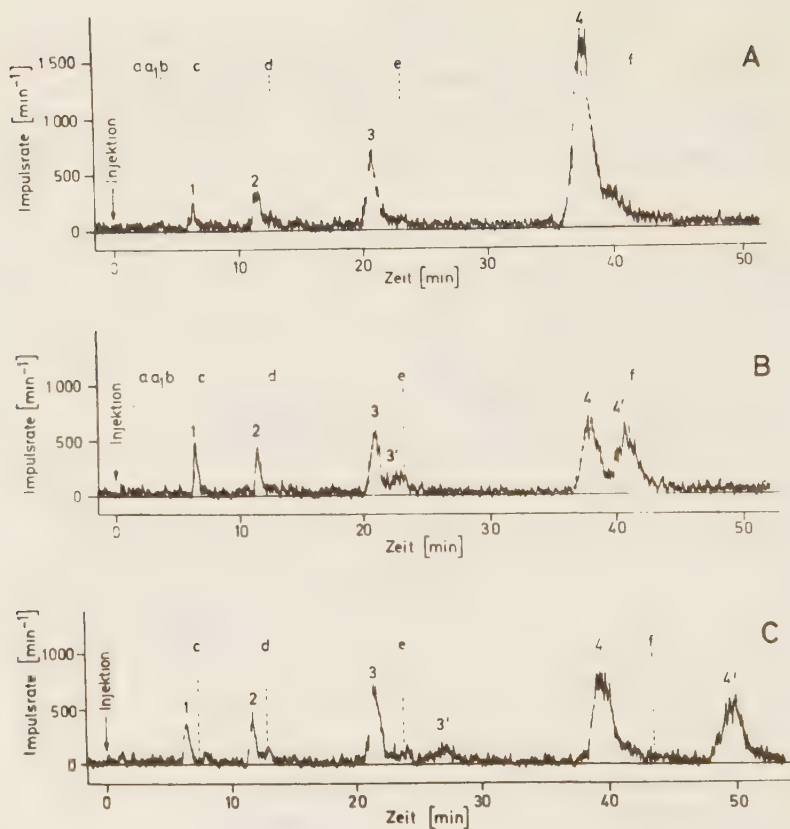


Fig. 35: Endprodukte der Fettsäuresynthese mit 4-Ketodecanoyl-CoA als Starter.

(Radiogaschromatogramm; Säulentyp 16 % SE 30 (2m), Temperatur 225°; Einzelheiten s. Exptl. Teil S.102)

A Malonyl-CoA-Zusatz sofort

B Malonyl-CoA-Zusatz nach 20 min Vorinkubation

C wie Ansatz B aber nach Trimethylsilierung der Methylester

Methylester der gesättigten Fettsäuren a) C₁₀ b) C₁₂ c) C₁₄ d) C₁₆ e) C₁₈ f) C₂₀; a₁) 4-Ketodecansäuremethylester

1-4 vermutlich Ketosäuremethylester C₁₂-C₁₈,

3' und 4' vermutlich Hydroxysäuremethylester C₁₆ und C₁₈

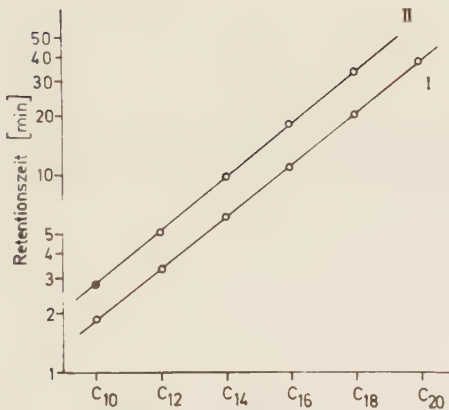


Fig. 36: Retentionszeiten der Massen- und Radioaktivitätsgipfel von Fig. 35 A in Abhängigkeit von der Kettenlänge

- I Retentionszeiten der gesättigten Fettsäuremethylester (C₁₀-C₂₀) im Massendiagramm
II Retentionszeiten der vermutlichen Ketosäuremethylester (C₁₂-C₁₈) im Radiogaschromatogramm
(--●-- 4-Ketodecansäuremethylester)

zeiten der in Figur 35 B gegenüber Figur 35 A neu aufgetretenen Säuren waren verändert (Fig. 35 C): Wie bei diesem Säulentyp (SE 30 *) erwartet (aufgrund von Vorversuchen mit anderen Hydroxysäuren), ergaben sich nach Trimethylsilierung längere Retentionszeiten.

Die Hydroxysäuren mußten durch Verlängerung von 4-Hydroxydecanoyl-CoA entstanden sein, das während der Vorinkubation aus 4-Ketodecanoyl-CoA gebildet worden war. Die gleichen Säuren erhielt man auch aus den oben beschriebenen Ketosäuren durch chemische Reduktion mit Kaliumborhydrid (Fig. 37 A). Zum Vergleich ist

*) SE 30 ist ein Siliconöl

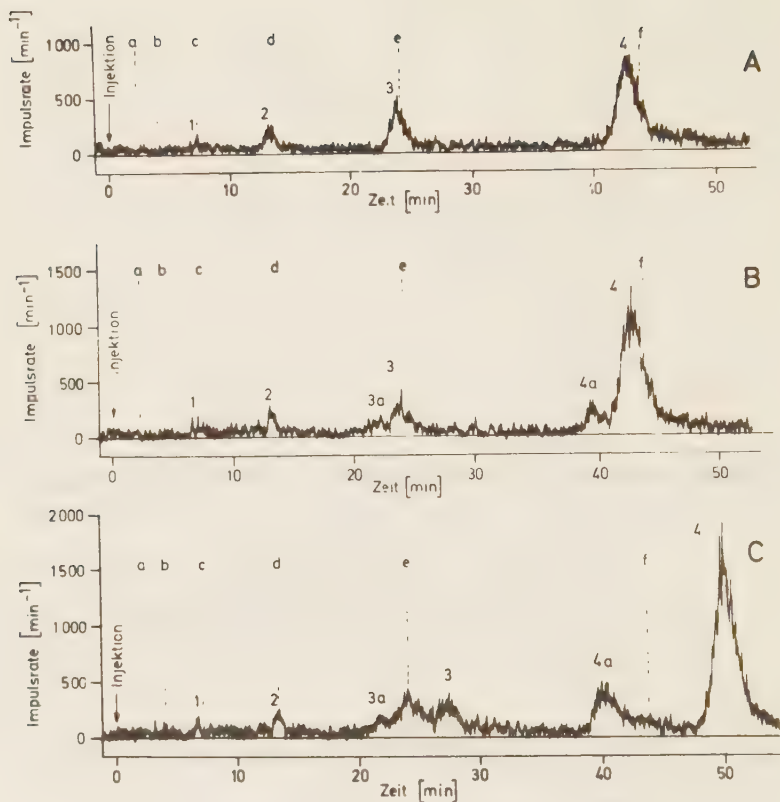


Fig. 37: Endprodukte der Fettsäuresynthese mit 4-Ketodecanoyl-CoA als Starter

(Radiogaschromatogramm; Säulentyp 16 % SE 30 (2m); Temperatur 225°; Einzelheiten s. Exptl. Teil S.103)

A Produkte nach Reduktion mit Kaliumborhydrid (Malonyl-CoA-Zusatz sofort)

B Malonyl-CoA-Zusatz nach 2 h Vorinkubation

C wie Ansatz B aber nach Trimethylsilierung der Methylester.

a) - f) wie bei Figur 35

1 - 4 vermutlich Hydroxysäuremethylester C₁₂-C₁₈

3a und 4a vermutlich Ketosäuremethylester C₁₆ und C₁₈

nochmals die Analyse eines Ansatzes wiedergegeben, bei dem 4-Ketodecanoyl-CoA mit Synthetase und NADPH lange vorinkubiert worden war, bevor Malonyl-CoA zugesetzt wurde (Fig. 37 B). Hier wurden fast ausschließlich Hydroxysäuren gebildet (s. dagegen Fig. 35 B), deren verändertes Verhalten in der Gaschromatographie nach Trimethylsilierung Figur 37 C zeigt. Eine entsprechende Veränderung der Retentionszeiten durch Trimethylsilierung ergab sich bei den durch chemische Reduktion erhaltenen Säuren.

Damit war ziemlich eindeutig nachgewiesen, daß die mit 4-Ketodecanoyl-CoA unmittelbar gebildeten höheren Fettsäuren Ketosäuren waren. Hier blieb also die Ketogruppe bei der Kettenverlängerung erhalten.

Bemerkenswert war die Tatsache, daß bei langer Vorinkubation von Synthetase mit 4-Ketodecanoyl-CoA und NADPH neben wenig Ketosäuren fast ausschließlich die höheren Hydroxysäuren gefunden wurden (Fig. 37 B), aber keine ungesättigten Säuren und kaum gesättigte Säuren. Die enzymatische Reduktion des 4-Ketodecanoyl-Restes erfolgte demnach viel rascher als eine Dehydrierung des Hydroxysäure-Restes, so daß sich das Hydroxyacyl-CoA-Derivat anhäufte. Eine Abschätzung der Geschwindigkeit dieser Reduktion anhand der Bedingungen von Figur 35 B (s. Exptl. Teil S. 103) ergab einen Wert, der ca. 2 % der Geschwindigkeit der normalen Fettsäuresynthese mit Acetyl-CoA ausmachte. Die Synthesegeschwindigkeit mit 4-Ketodecanoyl-CoA, die maximal etwa 20 % der normalen Synthesegeschwindigkeit erreicht, ist somit nur zehnmal größer als die der Reduktion.

Das bei der Reduktion vermutlich beteiligte Teilenzym der Synthetase, die 1. Reduktase, besitzt offenbar eine relativ geringe Spezifität. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß auch beim Test dieses Teilenzym mit S-Acetoacetyl-N-acetylcysteamin als Modellsubstrat die Reduktion relativ rasch verläuft. Die Spezifität dieses Teilenzym scheint so wenig ausgeprägt zu sein, daß sogar Dekalone enzymatisch reduziert werden konnten (Lit. 49). Da bei diesen Verbindungen keine kovalente Bindung an die Synthetase möglich ist, könnte man auch bei der Reduktion des 4-Ketodecanoyl-CoA auf die Annahme einer kovalenten Bindung an das Enzym verzichten (s. auch S. 56).

Das dehydratisierende Teilenzym besitzt anscheinend eine besonders hohe Spezifität, da ein 4-Hydroxydecanoyl-Rest, entstanden durch Reduktion des 4-Ketodecanoyl-CoA, kaum noch umgewandelt wurde. Die Reduktion eines β,γ -Decenoyl-Restes verlief wieder rascher, wie wir oben gesehen hatten (S. 56, Fig. 34 B) (ca. 0,1 % der Geschwindigkeit der normalen Synthese (s. S 56)). Es ergab sich damit für die untersuchten Derivate folgende Abstufung der Geschwindigkeiten der einzelnen enzymatischen Teilreaktionen: 4-Keto-Acyl-Reduktion (1. Reduktase) > Reduktion des β,γ -ungesättigten Acyl-Restes (2. Reduktase) > Dehydratisierung des 4-Hydroxyacylrestes (Dehydratase). In Klammern sind die vermutlich beteiligten Teilenzyme der Synthetase angegeben. Eine mögliche Erklärung für diese Abstufung wäre, wie schon angedeutet, eine entsprechende Abstufung der Spezifität der Teilenzyme.

6. Diskussion

Abschließend sei hier auf einige Punkte hingewiesen, die bisher noch nicht erörtert wurden.

Der Einsatz der verschiedensten Acyl-Derivate in die Fettsäuresynthese hat uns gezeigt, welche enzymatischen Fähigkeiten der Multienzymkomplex der Synthetase besitzt. Man darf aber nicht vergessen, daß die untersuchten Derivate keine physiologischen Substrate des Enzyms darstellten. Die Ergebnisse können daher kaum Aufschluß über das Geschehen in der Zelle geben, sondern dienen in erster Linie der weiteren Kennzeichnung des Enzymkomplexes.

Die auffallend rasche Fettsäuresynthese mit Decanoyl-CoA als Starter erklärten wir mit einer Acyltransferase, die für Acyl-Reste dieser Kettenlänge spezifisch ist. Für die Funktion einer derartigen Transferase in der Zelle hatten wir keine Erklärung gefunden. In der Hefe selbst sind keine Reaktionen bekannt, bei denen Acyl-Reste mit zehn Kohlenstoffatomen für die Fettsäuresynthese von besonderer Bedeutung sind. Bei Bakterien dagegen kennen wir bei der Biosynthese der Vaccensäure eine derartige Reaktion. Eine spezifische Dehydrase reagiert mit der β -Hydroxydecanoyl-Verbindung unter Bildung des β,γ -ungesättigten Acyl-Restes, der dann zur Vaccensäure verlängert wird (Lit. 73). Das Fehlen von Vaccensäure in der entwicklungsgeschichtlich höher stehenden Hefe kann unter anderem auf der Abwesenheit dieser Dehydrase beruhen. Die Fettsäuresynthetase aus Hefe besitzt jedenfalls, wie wir zeigen konnten, die Fähigkeit zur Bildung von Vaccensäure, wenn 3-Decenoyl-CoA anstelle von Acetyl-CoA in die Synthese eingesetzt wird. Im Hinblick auf die

Evolution des fettsäuresynthetisierenden Enzymsystems könnte man erwägen, ob die beschriebene " C_{10} -spezifische" Acyl-transferase ein entwicklungsgeschichtliches Relikt darstellt.

Unsere Versuche haben ergeben, daß auch einige Acyl-Reste mit funktionellen Gruppen von der Synthetase zu langkettigen Säureresten verlängert werden. Daraus ergibt sich in manchen Fällen die Möglichkeit, mit Hilfe der Synthetase im Mikromaßstab seltene Säuren enzymatisch zu synthetisieren, die auf chemischem Weg nur sehr schwer zugänglich sind.

In erster Linie entscheidet sich bei den Acyltransferasen der Synthetase, ob ein Acyl-Rest enzymatisch verlängert werden kann. Die Acyltransferasen spielen daher für den Enzymkomplex etwa die Rolle, die der äußeren Membran für ein Mitochondrion zukommt. Die Spezifität der Acyltransferasen entspricht bei diesem Vergleich der Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran. Der Multienzymkomplex der Synthetase stellt so gesehen eine nach außen abgeschlossene Einheit dar, was innerhalb der Zelle von Bedeutung ist. Mit Recht spricht man in diesem Zusammenhang von einer Kompartimentierung biochemischer Reaktionen (Lit. 6).

IV. Experimenteller Teil

A. Allgemeine Methoden

1. Verwendete Geräte

Photometer Eppendorf, Netheler und Hinz, mit und ohne Philipps-Kompensograph PR 2210 A/00

Spektralphotometer Zeiss M4 Q II

Registrierendes Spektralphotometer Cary Modell 14, Monrovia/USA

Präparative Ultrazentrifuge Beckman-Spinco Modell L

Servall Automatic Superspeed Centrifuge RC 2

Christ Tischzentrifuge Junior 1

pH-Meter der Firma Püsl, München, Typ 11/12

Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 314 EX

Fraktionskollektor, Zentralwerkstätten Göttigen

Radiopapierchromatograph FH 452, Friesseke und Hoepfner

Pherograph nach Wieland-Pfleiderer, Hormuth und Vetter

Dünnschichtscanner II LB 2722 mit Dual-Ratemeter-Integrator

LB 242 K und Linienschreiber, Firma Berthold, Wildbad

Hochdruckdampfsterilisator, Küster, Stuttgart

Großer Zellhomogenisator nach Merckenschlager und Schlossmann
(Eigenbau Moosbauer)

Gleichrichter zur Gelelektrophorese: Elphor-Drucktastengerät,
Bender und Hobein, München

Photomikroskop der Firma Zeiss

Kofler-Heizmikroskop, C. Reichert AG, Wien

Hamilton-Mikroliterspritzen 10, 25, 50 μ l, G. Schmidt, Hamburg

Gaschromatograph Aerograph 1520, Varian Aerograph, Darmstadt
Tri-Carb Verbrennungsofen Modell 325 mit heizbarer Verbindungs-
leitung, 2 Fuß lang

Tri-Carb Szintillations-Spektrometer Modell 3102 mit Gasdurch-
flußszintillationszelle (Volumen ca. 6 ml)

Einkanal-Ratemeter Modell 28A, Packard Instruments, Frankfurt/M.

Kompensationslinienschreiber Typ 5015, Meßbereich 0-1 mV,

Honeywell, Frankfurt/M.

Die zuletzt genannten fünf Instrumente waren zu einer Radiogas-
chromatographie-Einheit zusammengeschaltet.

2. Verwendete Präparate

Alle Coenzyme und Enzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von
der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen.

"Helicase" (L'Industrie Biologique Francaise S.A., Gennevilliers
(Seine), Frankreich)

Serumalbumin vom Rind (Behringwerke, Marburg)

1-¹⁴C-Natriumacetat und (methyl-¹⁴C)-Cholinchlorid (Radiochemi-
cal Centre, Amersham, England)

Sephadex (Pharmacia, Uppsala)

Dowex-2 und Dowex-50, Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid,

Triton-X-100, Tween 20, 40 und 80 (Serva, Heidelberg)

5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure, Lecithin, Undecansäure,

Palmitoleinsäure (C. Roth, Karlsruhe)

N-Äthylmaleinimid, Kaliumborhydrid, Äthylenimin, Diketen, Tetra-
methylenäthylendiamin (Th. Schuchardt, München)

3-Decensäure (K u. K. Laboratories Inc., Plainview, N.Y., USA)

9-Decensäure erhielten wir von Herrn Dr. J. Schultz.

Thioglykol, Vaccensäure, 3-Hydroxypropionsäure, Phosphorylcholin (Fluka)

Bacto-Pepton, Yeast-Extract und Purified Agar (Difco-Laboratories)

Alle anderen Chemikalien, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Merck, Darmstadt, im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

Acetyl-pantethein, Malonyl-pantethein und Benzoyl-pantethein erhielten wir von Herrn Dr. K. Willecke.

1-¹⁴C-Decanoyl-CoA und 1-¹⁴C-Palmityl-CoA stellte Dr. J. Ayling zur Verfügung.

Die verwendete Bäckerhefe wurde von der Firma Scheibe und Schertl KG., Oberkotzau bei Hof, durch die Großhandlung Hefe-Mayr, München, bezogen.

Die Anreicherung der Fettsäuresynthetase aus Bäckerhefe erfolgte nach "Methods of Enzymology", V, S. 443 (1962). Modifikationen wie in Lit.12 beschrieben.

Synthetase (bis zu 20 mg) wurde vor dem Einsetzen in Versuche der bei -15° C aufbewahrten Stammlösung entnommen, 1:4 mit 0,1 M KPO₄ pH 6,5 verdünnt und über eine Sephadex-G₂₅-Säule (1,5 x 20 cm) filtriert, die mit 0,1 M KPO₄ pH 6,5 äquilibriert war. Größere Enzymmengen wurden entweder dialysiert (gegen 0,01 M KPO₄ pH 6,5) oder nach Verdünnung mit Puffer-Lösung (0,01 M KPO₄ pH 6,5) in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

3. Herstellung von Substraten

a) Acyl-CoA-Derivate

Acetyl-CoA und Butyryl-CoA wurden durch Acylierung von CoA mit Acetanhydrid bzw. Buttersäureanhydrid (Lit. 40) erhalten (Ausbeuten: 70-90 %).

Malonyl-CoA wurde nach EGGERER und LYNEN (Lit. 41) durch Umesterung aus S-Malonyl-N-capryloylcysteamin gewonnen (Ausbeute: 90-100 %).

1-¹⁴C-Acetyl-CoA wurde nach WIELAND (Lit. 42) über das gemischte Anhydrid aus 1-¹⁴C-Essigsäure und Chlorameisensäureäthylester dargestellt (Lit. 31).

1-¹⁴C-Malonyl-CoA wurde durch Carboxylierung von 1-¹⁴C-Acetyl-CoA mittels Acetyl-CoA-Carboxylase gewonnen (Lit. 43). In mehreren Teilansätzen wurden 13,5 µMol 1-¹⁴C-Acetyl-CoA ($7,6 \times 10^6$ Ipm/µMol) eingesetzt. Ein Ansatz enthielt in 2,0 ml: 100 µMol Tris pH 7,5, 1,6 mg Serumalbumin, 20 µMol ATP, 20 µMol MgCl₂, 20 µMol Natriumcitrat, 10 µMol Glutathion, 50 µMol KHCO₃, 1-1,5 µMol 1-¹⁴C-Acetyl-CoA. Gestartet wurde durch Zusatz von 140-200 mE Acetyl-CoA-Carboxylase⁺). Inkubation: 60 min bei 25° C. Nach Bestimmung des gebildeten Malonyl-CoA (Ausbeute: 23,7 %) wurde mit Dowex-50 (H⁺-Form) angesäuert.

Die Isolierung und Reinigung des 1-¹⁴C-Malonyl-CoA erfolgte durch Chromatographie an Dowex-2 (Formiat-Form) unter Zusatz von unmarkiertem Malonyl-CoA (9,9 µMol). Danach noch vorhandenes 1-¹⁴C-

⁺) Acetyl-CoA-Carboxylase erhielten wir von Dr. G. Henniger, Max-Planck-Institut für Zellchemie. Aktivitätsbestimmung erfolgte nach Lit. 44.

Acetyl-CoA wurde zu Citrat umgewandelt durch Inkubation mit Malat, Malat-Dehydrogenase und Citrat-Synthase (Bedingungen entsprechend der Acetyl-CoA-Bestimmung nach Lit. 45). Nach erneuter Chromatographie an Dowex-2 erhielten wir ein genügend reines Präparat, das sich für den radiochemischen Synthetase-Test (s. S. 73) eignete.

Chromatographie an Dowex-2 (Formiat) (0,9 x 30 cm) nach Lit. 13: Die Probe wurde neutral aufgegeben. Nach Elution mit 4 M Ameisensäure wurde ein logarithmischer Gradient von Ammoniumformiat angelegt (Lösungen: 4 M HCOOH/0,6 M Ammoniumformiat und 4 M HCOOH/1,3 M Ammoniumformiat; Mischvolumen: 500 ml; Fraktionsvolumen: 11 ml). In den Fraktionen wurde Radioaktivität und optische Dichte bei 260 m μ bestimmt. Das Eluat wurde von Ameisensäure und Ammoniumformiat befreit durch Abziehen der Ameisensäure, Behandeln der Lösung mit Dowex-50 (H⁺-Form) und erneutes Abziehen der gebildeten Ameisensäure.

Von den eingesetzten 13,1 μ Mol Malonyl-CoA wurden 6,35 μ Mol (48,5 %) nach der zweifachen Chromatographie wiedergewonnen. Gesamtausbeute (bezogen auf 1-¹⁴C-Acetyl-CoA): 11,5 %. Spezifische Radioaktivität des 1-¹⁴C-Malonyl-CoA: $1,75 \times 10^6$ Ipm/ μ Mol.

Alle anderen CoA-Derivate wurden über die gemischten Anhydride der betreffenden Säuren mit Chlorameisensäureäthylester dargestellt (Lit. 42):

Je 100 μ Mol freie Säure wurden in 2 ml absolutem THF gelöst und 0,02 ml absolutes Triäthylamin zugesetzt. Bei -20° wurden 104 μ Mol Chlorameisensäureäthylester, gelöst in absolutem THF, zugegeben. Die Mischung blieb 2 h bei -20° stehen, wobei sich Tri-

äthylammoniumchlorid abschied. Eine frische Lösung von 30 μMol CoA in 1 ml Wasser wurde mit N/10 Natronlauge auf pH 8-9 gebracht; zu dieser Lösung wurde die Lösung des gebildeten gemischten Anhydrids bei Raumtemperatur portionsweise zugesetzt, wobei der pH-Wert bei 8-9 (mit N/10 NaOH) gehalten wurde. Nach vollständiger Acylierung (Nitroprussid-Reaktion negativ, verzögerte Nitroprussid-Reaktion positiv (s. S.75) wurde mit Dowex-50 (H^+ -Form) angesäuert und die Lösung 4-5 h mit peroxidfreiem Äther perforiert. Danach wurde der pH-Wert auf 5-6 eingestellt und die Lösung lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 2-3 ml Wasser gelöst (pH 5-6). Gehaltsbestimmung s. S. 74 .

b) Sonstige Verbindungen

Pantethein wurde nach Lit. 46 aus Benzoyl-pantethein durch alkalische Hydrolyse erhalten. Dabei wurde unter Stickstoff gearbeitet und die entstandene Benzoessäure nach Ansäuern mit 2 N HCl mit peroxidfreiem Äther extrahiert. Nach Neutralisation wurde mit Ellmanns Reagens (DTNB) (s. S. 76) der Gehalt an Pantethein bestimmt. Ausbeute: 50-60 %.

S-Acetoacetyl-N-acetylcysteamin wurde aus N-Acetylcysteamin, hergestellt nach KUHN (Lit. 47), und Diketen dargestellt (Lit. 12,48). $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-pantethein wurde nach der gleichen Methode wie $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA (s. oben) gewonnen.

4. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Synthetase-Standardtest (Optischer Test) (Lit. 31)

Eine Küvette (d = 1 cm) enthielt in 2,0 ml Gesamtvolumen: 200 μMol KPO_4 pH 6,5, 20 μMol Cystein, 0,6 mg Serumalbumin, 0,24 μMol

Acetyl-CoA, 0,3 μ Mol NADPH und 5-20 γ Enzym. Bei 334 m μ und 25° wurde zwei bis drei Minuten der Blindlauf beobachtet und dann die Reaktion mit 0,15 μ Mol Malonyl-CoA gestartet. Als Milli-einheit (mE) ist der Umsatz von 1 μ Mol Malonyl-CoA pro Minute definiert. Das entspricht einem Verbrauch von 2 μ Mol NADPH/min (ΔE 0,006). Die spezifische Aktivität wird in mE pro mg Enzym angegeben.

Radiochemischer Synthetasetest (Lit. 31)

Ein Reagenzglas enthielt in 1,5 ml Gesamtvolumen: 100 μ Mol KPO_4 pH 6,5, 15 μ Mol Cystein, 0,6 mg Serumalbumin, 0,1 μ Mol Acetyl-CoA, 1 μ Mol Glucose-6-phosphat, 0,2 μ Mol NADP, 0,01 mg (ca. 3,5 IE) Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, und 0,2 - 2 mE Synthetase. Start mit 0,05 μ Mol 1-¹⁴C-Malonyl-CoA (30 000 Ipm). Nach 15 min Inkubation bei 37° wurde die Reaktion mit 1 ml 10 %iger methanolischer Kalilauge (70 Vol% Methanol) abgestoppt. Nach Zusatz von je 2,5 μ Mol Palmitin- und Stearinsäure als Träger wurde der Ansatz durch 30 min Rückflußkochen auf dem Wasserbad verseift. Die alkalische Lösung wurde zweimal mit je 3 ml Petroläther (40-60°) extrahiert und dann mit 1 ml 12 N H_2SO_4 angesäuert. Dann wurde viermal mit je 3 ml Petroläther extrahiert; die vereinigten Petrolätherextrakte wurden einmal mit 3 ml 3 N Essigsäure und dreimal mit je 3 ml Wasser gewaschen. Nach Abziehen des Petroläthers am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand mit 15 ml Szintillations-Lösung (s. S. 77) aufgenommen und seine Radioaktivität bestimmt. Der Test wurde mit gereinigter Synthetase durch den optischen Test geeicht (Fig. 38). Über den Bereich von 0,1 - 2 mE hinaus war keine Linearität des Testes mehr gegeben.

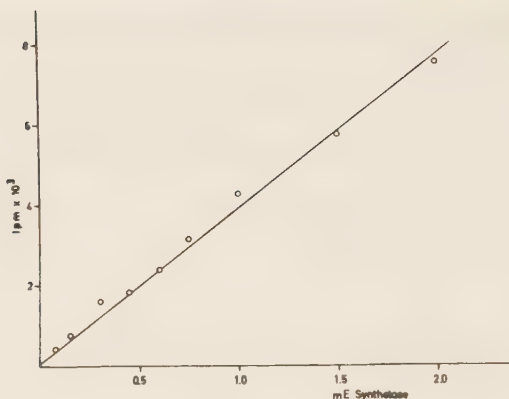


Fig. 38: Eichkurve zwischen optischem und radiochemischem Fettsäuresynthetasetest

5. Bestimmung von Substratkonzentrationen

Acetyl-CoA wurde im gekoppelten Test mit Malat-Dehydrogenase und Citratsynthase nach BUCKEL und EGGERER (lit. 45) bestimmt.

Malonyl-CoA wurde im optischen Test mit Fettsäuresynthetase bestimmt.

Andere CoA-Derivate und Thioester wurden nach allgemeinen Methoden bestimmt. Dazu gehörte die Umsetzung mit Hydroxylamin zu Hydroxamsäuren nach STADTMAN (Lit. 50) und die Färbung der verzögerten Nitroprussid-Reaktion (VNP) nach LYNEN (Lit. 51). Auch die Thioesterabsorption bei 233 m μ ($\epsilon = 4600 \text{ cm}^2/\text{mMol}$) diene zur Gehaltsbestimmung, konnte allerdings bei CoA-Derivaten wegen deren hohen Absorption bei 260 m μ nicht benutzt werden.

Differenzspektren

Eine allgemeine Methode zur Gehaltsbestimmung von CoA-Derivaten bestand in der indirekten Messung der Thioesterabsorption bei 233 m μ durch Differenzmessung. Dabei wurde eine Acyl-CoA-Lösung gegen eine Vergleichsküvette gemessen, in der die gleiche Menge Acyl-CoA verseift worden war. Das dabei erhaltene Differenzspektrum zeigte nur die Thioesterabsorption bei 233 m μ des CoA-Derivates, aus der sich der Gehalt an Acyl-CoA berechnen ließ ($\epsilon_{233} = 4600 \text{ cm}^2/\text{mMol}$). Ausführung: Die Meßküvette enthielt in 0,04 M KPO₄ pH 6,5 eine bestimmte Menge Acyl-CoA (Volumen 2,0 ml). In die Vergleichsküvette wurde die gleiche Menge Acyl-CoA gegeben, 0,2 ml 2 N NaOH zugesetzt und auf 1,0 ml mit Wasser aufgefüllt. Nach 15-30 min wurde 0,2 ml 2 N HCl und 0,8 ml 0,1 M KPO₄ pH 6,5 zugegeben. Danach wurde das Differenzspektrum aufgenommen. Auf vollständige Verseifung des CoA-Derivates in der Vergleichsküvette mußte geachtet werden. Bei CoA-Derivaten von wasserunlöslichen Säuren mußte sehr vorsichtig neutralisiert werden, da andernfalls leicht Trübung in der Vergleichsküvette auftrat. Diese konnte aber durch Zusatz von 0,2 ml Methanol beseitigt werden.

Bestimmung von Thiolen

Der qualitative Nachweis von Thiolen erfolgte im Tüpfeltest mit 2 %iger Natriumnitroprussid-Lösung in bicarbonathaltiger Lösung (Nitroprussid-Reaktion (NP)). War dieser Test negativ (keine Violettfärbung), konnte anschließend durch Zusatz eines Tropfens konzentrierter Ammoniaklösung auf Thioester geprüft werden (verzögerte Nitroprussidreaktion (VNP)).

Zur quantitativen Bestimmung von Thiolen diene die

Bestimmung mit DTNB (Ellmanns Reagens) (Lit. 52)

Eine Küvette (d = 1 cm) enthielt in 1,0 ml 70 μ Mol Tris pH 7,5, 0,1 ml frisch bereitete DTNB-Lösung (19,8 mg ad 5 ml, mit wenig NaHCO_3 neutralisiert) und 5-30 μ Mol Thiol. Bei 405 m μ wurde gegen eine Vergleichsküvette, die kein Thiol enthielt, die Extinktion bestimmt. Mit dem Extinktionskoeffizienten des gebildeten Thiophenolats ($\epsilon_{405} = 13\,300\text{ cm}^2/\text{mMol}$ (Lit. 12)) erhielt man den Thiolgehalt.

Auf diese Methode gründete sich auch eine Bestimmung für Acyl-CoA. Dabei wurde der CoASH-Gehalt einer Acyl-CoA-Lösung vor und nach Verseifung gemessen. Aus der Differenz ergab sich der Thioestergehalt.

Zum Nachweis von Thiolen und Thioestern auf Papier und Dünnschichtplatten eignete sich folgendes Verfahren (Lit. 50): Man besprühte die zu untersuchende Fläche mit Lösung A, ließ trocknen und sprühte dann mit Lösung B. Thiole und Thioester ergaben rosa Flecken auf gelbem Grund. Dies Verfahren war auch für schwerlösliche Palmityl-thioester geeignet.

Lösung A: 1,5 g Nitroprussidnatrium Lösung B: 2 g NaOH

(klar filtriert) 5 ml 2 N H_2SO_4	5 ml Wasser
95 ml Methanol	95 ml Methanol
10 ml 25 % Ammoniaklösung	

6. Sonstige Bestimmungsmethoden

a) Protein

Zur Proteinbestimmung wurde meist die Biuretmethode nach BEISENHERZ et al. (Lit. 53) verwendet. Für trübe Lösungen eignete sich

die Variante nach JACOBS et al. (Lit. 54) unter Zusatz von Natriumdesoxycholat. Bei reinen Proteinlösungen konnte das Verfahren von MURPHY und KIES (Lit. 55) benutzt werden, bei dem die Differenz der Extinktion bei 215 und 225 m μ bestimmt wird (geeichte Quarzküvetten verwenden!). In verdünnten Proteinlösungen wurde nach WARBURG und CHRISTIAN (Lit. 56) oder nach LOWRY (Lit. 57) verfahren.

b) Radioaktivität

Zur ^{14}C -Messung diente die Szintillationszählung. Bei wässrigen Lösungen wurde eine Probe auf einem Papierstreifen (Whatman I, 3x7,5 cm) aufgetragen, eingetrocknet und in Szintillationslösung gezählt. Toluollösliche Substanzen wurden direkt in Szintillationslösung gezählt.

Szintillationslösung: 4 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 200 mg 1,4-Bis-2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-Benzol (POPOP) pro Liter absolutem Toluol.

7. Gaschromatographische Analyse

a) Vorbereitung der Proben

Die Inkubationsansätze wurden mit 1 ml 10 %iger methanolischer Kalilauge gestoppt. Je nach Art des Ansatzes und der erwarteten Endprodukte wurden je 1-25 μMol freie Säure als Träger zugesetzt. Durch 30 min Rückflußkochen auf dem Wasserbad wurden die Proben verseift. Nach Ansäuern mit 1 ml 12 N H_2SO_4 wurden die Fettsäuren durch 4malige Extraktion mit je 3 ml Petroläther (Sp. 40-60 $^\circ$) extrahiert. Die Extrakte wurden unter Stickstoff zur Trockne gebracht und der Methylierung mit Borfluorid/Methanol unterworfen. Dazu wurden 0,4 ml einer 7 %igen Borfluoridätherat-

Lösung in absolutem Methanol zugesetzt. Nach 4 min Inkubation bei 60° unter Feuchtigkeitsausschluß wurden 2 ml Petroläther zugesetzt. Die Proben wurden noch 2 min bei 60° stehen gelassen. Dann wurde zur Zersetzung von BF_3 ca. 5 ml Wasser zugesetzt, wobei sich 2 Phasen bildeten, die anfangs noch trüb waren. Sobald die Petrolätherphase klar war (nach 1-3 h), wurde sie abpipettiert. Dieser Petrolätherextrakt der Fettsäuremethylester wurde zur Trockne gebracht und mit einem bestimmten Volumen Essigester zurückgelöst.

b) Gaschromatographie

Die in Essigester gelösten Methylester wurden in den ca. 250° heißen Injektorblock des Gaschromatographen injiziert. Es schloß sich eine spiralförmige Trennsäule von 1,5 m, 2 m bzw. 3 m Länge und 1/8" Außendurchmesser (Wandstärke 0,25 mm) an. Die Trennsäule*) war mit Chromosorb W.a.W. 80-100 mesh gefüllt, das entweder mit 14 % NPGS, 15 % PEGS oder 16 % SE 30 beladen war. Die Säulentemperatur war von dem Säulentyp und der zu analysierenden Probe abhängig (Säulentyp und Säulentemperatur sind bei jedem Gaschromatogramm angegeben). Durch einen He-Strom von ca. 25 ml/min gelangten die injizierten Substanzen über den Wärmeleitfähigkeitsdetektor (Heizstrom der WX-Filamente: 150 mA; Temperatur des Detektorblockes 300°) und über eine 290° heiße Verbindungsleitung in das auf 750° erhitzte CuO-Rohr des Verbrennungsofens. Das bei der Verbrennung entstandene Wasser wurde in einem Magnesiumperchlorat-Rohr absorbiert. Das Gemisch

*) Die Trennsäulen für die Gaschromatographie wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Jauch, Herrn M. Sumper und Herrn Dr. B. Hamprecht zur Verfügung gestellt.

aus He und $^{14}\text{CO}_2$ durchströmte nun eine Anthracendurchflußzelle des Szintillationszählers. Ein dahinter geschaltetes Natron-asbest-Rohr verhinderte den Austritt von $^{14}\text{CO}_2$ in die Umgebung.

B. Beschreibung der Versuche

Zu Kapitel II

1. Kultivierung von Bäckerhefe

Aus abgepreßter Bäckerhefe wurde durch mehrmaliges Ausplantieren auf Agar-Platten (Zusammensetzung: 2 % Bacto-Peptone, 1 % Yeast-Extract, 2 % Glucose, 1,5 % Agar) eine Hefekultur gewonnen, die auf Schrägagar weitergezüchtet und alle 14 Tage überimpft wurde.

Von dieser Kultur wurde in 25 ml Nährmedium eingeeimpft (Nährmedium: 2 % Bacto-Peptone, 1 % Yeast-Extract, 2 % Glucose). Nach 12 stündigem Wachstum wurde dieses Inoculum in 1 l Nährmedium überimpft. Aus diesem Ansatz wurde die Hefe nach 6-7 stündigem Wachstum geerntet (Wachstumsbedingungen: Aerob unter Schütteln (große Schüttelmaschine 80 Upm/min) bei 30°).

Zur Kontrolle des Wachstums und zur Feststellung eines günstigen Erntezeitpunktes (s. S. 9) wurden Wachstumskurven aufgenommen (Fig. 39). Dazu pipettierten wir zu verschiedenen Zeiten je 1 ml der Hefesuspension steril ab, verdünnten mit Wasser auf 5 ml und bestimmten die Extinktion bei 600 m μ im Zeiss-Spektralphotometer unter Verwendung der Photozelle.

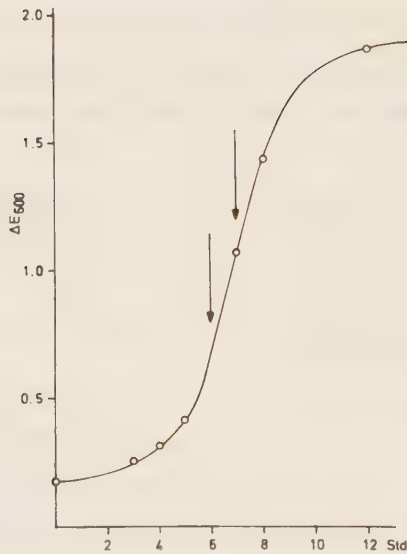


Fig. 39: Wachstumskurve von *Saccharomyces cerevisiae*

(Die Pfeile geben die zeitlichen Grenzen an, in denen die Hefe geerntet wurde)

2. Bereitung von Protoplasten

Die abzentrifugierte Hefe wurde zweimal mit kaltem Wasser gewaschen. Die Vorbehandlung mit Thioglykol erfolgte in einer 10 %igen Hefesuspension in folgendem Medium: 0,8 M Mannit, 0,01 M Tris pH 7,5, 0,01 M Thioglykol). Diese Suspension wurde 30 min bei 30° geschüttelt. Dann wurde die Hefe abzentrifugiert, zweimal mit kaltem Inkubationsmedium (I-Medium: 0,8 M Mannit, 0,01 M Tris pH 7,5) gewaschen und in diesem Medium in eine 10 %ige Suspension gebracht. Dazu wurde "Helicase" (10 mg/ml) gegeben. Die Inkubation erfolgte etwa 2 Stunden bei 30° unter Schütteln. Danach wurden die gebildeten Protoplasten abzentrifugiert (10 min bei 2000 g) und dreimal mit kaltem I-Medium gewaschen.

Zur Messung der Protoplastenbildung (s. Fig. 3, S. 8) wurden der Suspension zu bestimmten Zeiten je 2 Proben von 0,1 ml entnommen. Die eine Probe wurde isotonisch verdünnt mit 10 ml Mannitlösung (0,8 M), die andere hypotonisch mit 10 ml Wasser. Die Differenz der Trübung beider Proben bei 600 m μ (ΔE in Fig. 3) galt als Maß für die Protoplasten-Ausbeute (0,5 - 0,8). Als Kontrolle (s. Fig. 3, Kurve III) diente eine Suspension von vorbehandelter Hefe ohne Helicase.

3. Zellfraktionierung

Alle Operationen wurden bei + 4° ausgeführt.

0,5 g Protoplasten wurden mit 10 ml Fraktionierungsmedium versetzt (F-Medium: 0,25 M Saccharose, 0,05 M KPO₄ pH 6,5, 0,004 M MgCl₂), 15 min stehen gelassen, viermal je 2,5 min homogenisiert, indem die Mischung mit einem Plümper in einem engen Zentrifugenglas unter Eiskühlung schnell gerührt wurde. Der Grad des Aufschlusses wurde mikroskopisch kontrolliert. Dieses Homogenat wurde nach dem angegebenen Schema (Fig. 4) der fraktionierten Zentrifugation unterworfen. Zur Zentrifugation bei 2000 g und 9000 g diente eine Servall-Zentrifuge (kl. Rotor), die Zentrifugation bei 59 000 g wurde mit einer Spinco-Ultrazentrifuge (Rotor Nr. 40, 30 000 rpm) ausgeführt. Die Niederschläge wurden mit F-Medium homogen geplümpert. Die Aktivitätsteste wurden möglichst unmittelbar nach jedem Zentrifugationsschritt ausgeführt.

4. Gradientenversuche

In Zentrifugenbechern wurden in 30 ml bei + 4° ein linearer Gradient von 5-20 % Rohrzucker aufgebaut. Vor Verwendung blieben

die Gradientenbecher 1-2 Stunden zur Äquilibrierung im Kühlraum (+ 4°) stehen. Der Zucker war in 0,02 M KPO_4 pH 6,5, 0,004 M MgCl_2 gelöst.

Die mitochondrienfreien Überstände (Fraktion F_4) wurden so verdünnt, daß ihre Dichte unter der einer 5 %igen Zuckerlösung lag. Dann wurde 1 ml auf einen Gradienten aufgesetzt. Auf einen Kontrollgradienten wurde gereinigte Synthetase gegeben (externer Standard). Die Zentrifugation der Gradienten erfolgte 8 h im swinging-bucket-Rotor SW 25,1 bei 24 000 rpm (90 000 g) in einer Spinco-Ultrazentrifuge. Der Inhalt der Gradientenbecher wurde in 20 Fraktionen von je 1,5 ml aufgeteilt.

Zu Fig. 5 (S. 13)

Aufgesetzt wurden 4,9 mg Protein von F_4 , die 47,7 mE Synthetase enthielten (Kontrolle: 133 mE Synthetase; 800 mE/mg). Von jeder Fraktion wurde 0,2 ml für den radiochemischen Synthetasetest eingesetzt, 0,01 ml für den Alkoholdehydrogenase-Test und 0,5 ml für den Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Test.

Wiedergefunden: 40 % der Synthetaseaktivität (Kontrolle 60 %), 52 % der Alkoholdehydrogenaseaktivität und 80 % der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Aktivität.

Alkoholdehydrogenase-Test

Eine Küvette enthielt in 2,0 ml: 150 μMol Tris pH 8,1, 2 μMol NAD^+ und 0,1 ml unvergällten Äthylalkohol und pro Fraktion 0,01 ml der Gradientenlösung. Die Bildung von NADH wurde anhand der Extinktionszunahme bei 366 μm gemessen ($1 \text{ mE} \hat{=} \Delta E / \text{min } 0,00165$).

Glucose-6-Phosphatdehydrogenase-Test

Eine Küvette enthielt in 2,0 ml: 200 μ Mol Triäthanolaminpuffer pH 7,6, 20 μ Mol MgCl_2 , 1 μ Mol NADP^+ , 1 μ Mol Glucose-6-Phosphat und pro Fraktion 0,5 ml Gradientenlösung. Die Bildung von NADPH wurde anhand der Extinktionszunahme bei 334 μ gemessen ($1 \text{ mE} \hat{=} \Delta \text{E/min } 0,003$).

Zu Fig. 6 (S.15)

4,75 mg Protein von F_4 wurden aufgesetzt (24,1 mE Synthetase; 242 000 Ipm) (Kontrolle: 1630 mE; Synthetase; 800 mE/mg). Zum Synthetasetest wurden pro Fraktion 0,2 ml verwendet, für Radioaktivitätsmessung je 0,2 ml.

Wiedergefunden: 40 % der Synthetaseaktivität (Kontrollgradient 65 %), 87 % der Radioaktivität.

5. ^{14}C -Cholin-Markierung

Bei diesen Versuchen wurde ein vallsynthetisches Nährmedium zur Hefezucht verwandt. Es enthielt pro Liter: 50 g Glucose, 1,8 g KH_2PO_4 , 425 mg KCl, 125 mg $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 125 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2,5 mg $\text{FeCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 5 g K_3 -citrat, 1 g Citronensäure, 3,75 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mg L-Histidin, je 20 mg DL-Methionin, DL-Tryptophan, L-Asparagin, 25 mg m-Inosit, 20 γ Biotin, 20 γ Folsäure, 0,2 mg p-Aminobenzoesäure, 0,2 mg Riboflavin, je 0,4 mg Thiamin·HCl, Pyridoxin, Ca-Pantothenat und Niacin, sowie 9,3 μ Mol ^{14}C -Cholin (18×10^6 Ipm). Auch für dieses Medium wurde eine Wachstumskurve der Hefe aufgenommen. Entsprechend Figur 39 wurde die Hefe in der frühen logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Protoplastenbildung und Vorfraktionierung wie üblich.

Zum Gradienten von F_4 s. S. 33 .

Zur Untersuchung der radioaktiven Verbindungen wurden zuerst die Lipide mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1) nach Lit. 58 extrahiert. Nach Einengen der Lösung wurden die Lipide der Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser) (65:25:4) oder der Papierchromatographie (Laufmittel: n-Propanol/Wasser (8:1)) unterworfen, wobei Lecithin zugesetzt wurde.

Der Rückstand der Lipidextraktionen enthielt wasserlösliche radioaktive Verbindungen. Da sowohl die Fraktion F_4 als auch besonders die Gradientenfraktionen viel Zucker enthielten, der die Analyse erschwerte, untersuchten wir diese Verbindungen in einem zuckerfreien Homogenat, das wir durch Osmolyse von restlichen Protoplasten des ^{14}C -Cholin-Ansatzes erhielten. Der lipidfreie wasserlösliche Rückstand wurde der Papierchromatographie (Laufmittel: Äthanol/Wasser (8:1)) n-Propanol/Wasser (8:1)), sowie der Papierelektrophorese (Pyridin-Acetat pH 6,2; 1300 V, 100 mA; Laufzeiten 1/2 und 1 h) unterworfen. Als Träger wurden dabei Cholin, Phosphorylcholin und CDP-Cholin zugesetzt. Zum Nachweis der Verbindungen auf Papier dienten Sprühreagenzien:

für Cholin und Lecithin (auch für Dünnschicht)	Dragendorff-Reagenz bestehend aus basischem Wismutnitrat und Kaliumjodid (Lit. 59)
für Phosphorylcholin und CDP-Cholin	Phosphatreagenz bestehend aus Ammoniummolybdat nach Lit. 60
für Cholin und Phosphorylcholin	eignete sich ein Verfahren nach Lit. 61, das Phosphomolybdänsäure und SnCl_2 verwendet.

6. Disk-Elektrophorese

Die Disk-Elektrophoresen wurden in der Anordnung von Willecke (Lit. 37) nach Maurer (Lit. 62 System 6 mit 3,7 %igem Polyacrylamid-Gel (ohne Sammelgel)) ausgeführt. Elektrodenpuffer: 5,52 g Diäthylbarbitursäure, 1 g Tris, pH 7,0 ad 1 l.

7. Phospholipase D

Zu Figur 9: Die Inkubation enthielt in 1 ml: 5,8 mg Synthetase (1175 mE/mg), 50 μ Mol Na-Acetat pH 5,6, 10 μ Mol CaCl_2 , 3,2 mg Phospholipase D. Temperatur 25°. Die Kontrolle enthielt alle Zusätze außer Phospholipase D. Zum Synthetase-Test wurden je 0,01 ml der Mischung entnommen.

Der Zusatz von CaCl_2 hatte, wie wir später feststellten, keinen Einfluß auf die Inaktivierung.

Die Präparate enthielten 39 % Protein und ergaben getrübe Lösungen. Bei Dialyse gegen M/100 Na-acetat pH 5,6 (14 h bei + 4°) verstärkte sich die Trübung wahrscheinlich infolge von Protein-denaturierung. Infolgedessen beobachteten wir z.B. statt einer 76 %igen Inaktivierung mit nichtdialysierter Phospholipase D nur noch eine 51 %ige Inaktivierung mit dem dialysierten Präparat.

Ein Kochsaft des Präparates verlor erst nach längerem Kochen vollständig seine Fähigkeit zur Inaktivierung (6 h Rückfluß-kochen bei 110° Badtemperatur).

Der Test auf Proteinase wurde nach Lit. 63 ausgeführt. Der Testansatz enthielt in 2,0 ml: 10 mg Serumalbumin, 100 μ Mol Na-acetat pH 5,6, 10 μ Mol CaCl_2 , 2 mg Phospholipase D. Nach 60 min Inkubation bei 25° wurde mit 1 ml 1 M Trichloressigsäure (TCE) abge-

stoppt, der Niederschlag abzentrifugiert und im Überstand die Extinktion bei 280 m μ bestimmt gegen einen Vergleichswert, der durch sofortiges Abstoppen eines Parallelansatzes mit TCE erhalten wurde. Wir fanden bei Phospholipase D keine proteolytische Aktivität im Gegensatz zu Testansätzen mit Pronase und Pepsin.

Zum Test der Teilaktivitäten

766 γ Synthetase (1795 mE/mg) wurden in 1 ml mit 4,5 mg Phospholipase D, 10 μ Mol CaCl₂ und 50 μ Mol Naacetat pH 5,6 bei 25° inkubiert. Nach 3 h war eine Inaktivierung der Synthetase von 70 % erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Teilaktivitäten der Synthetase nach Lit. 64 bestimmt. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Phospholipase D.

Für die Messung des Acetyltransfers macht man sich den Austausch nach der Gleichung

$^{14}\text{C-Acetyl-CoA} + \text{Pantethein} \rightleftharpoons ^{14}\text{C-Acetylpantethein} + \text{CoA}$
zunutze und bestimmt entstandenes $^{14}\text{C-Acetylpantethein}$.

Bei der 1. Reduktion wird die Reduktion des Modellsubstrates S-Acetoacetyl-N-acetylcysteamin gemessen. Man bestimmt den NADPH-Verbrauch.

Die 2. Reduktion wird durch Reduktion von Dichlorphenolindophenol unter NADH-Verbrauch erfaßt (Lit. 37).

Fig. 40 zeigt das Ergebnis dieser Tests mit Phospholipase-D-inaktivierter Synthetase und mit unbehandelter Synthetase (Kontrolle). Auf der Abszisse sind die dem obigen Ansatz entnommenen Volumina angegeben.

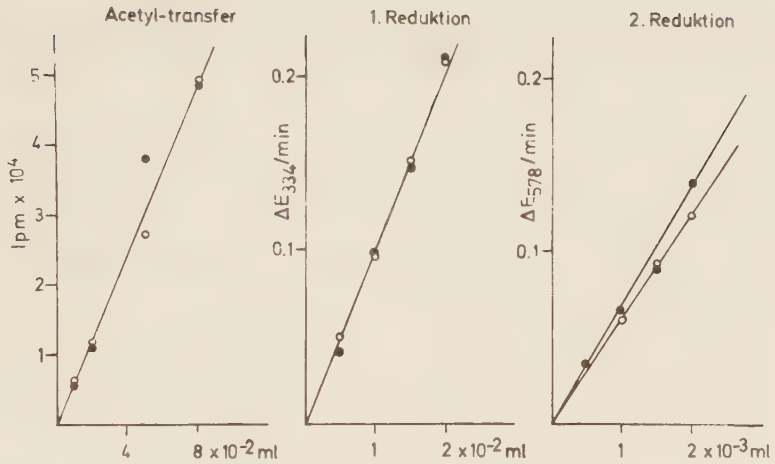


Fig. 40: Test der Teilaktivitäten der Synthetase

--●-- ungehemmte Synthetase

--○-- Synthetase nach Phospholipase-D-Hemmung

Phosphodiesterase-Test mit Bis-p-Nitrophenylphosphat ("Bis")

bei pH 9,2: Der Testansatz enthielt 0,6 ml 1 M Tris pH 9,2,
1,0 ml "Bis"-Lösung (45 mg in 5 ml 0,2 M Tris
pH 9,2)

Enzymlösung und Wasser ad 3,0 ml

Bei 405 mμ wurde die Entstehung des dunkelgelb gefärbten p-Nitrophenolats ($\epsilon = 18,5 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$) gemessen (1 mE Phosphodiesterase $\hat{=}$ $\Delta E_{405}/\text{min } 0,0061$).

bei pH 5,6: Der Testansatz enthielt 0,98 ml "Bis"-Lösung

(gesättigte Lösung in 0,1 M Natriumacetat pH 5,6)

Zum Zeitpunkt 0 wurde Enzym und Wasser ad 1,0 ml zugefügt. Nach einer bestimmten Zeit (2-10 min) wurden 2 ml 0,5 N NaOH zugesetzt. Die Extinktion bei 405 mμ wurde sofort gegen eine Ver-

gleichsküvette mit einem Kontrollansatz ohne Enzym gemessen. Figur 41 zeigt die Phosphodiesterase-Aktivität von Phospholipase D bei pH 5,6 und pH 9,2.

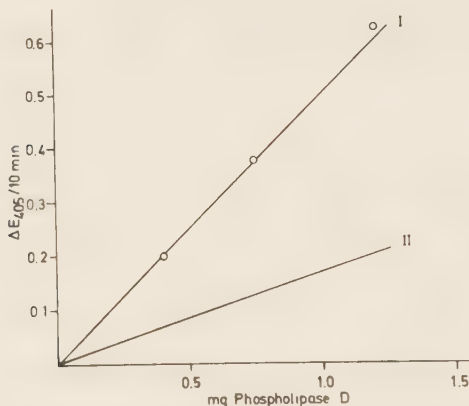


Fig. 41: Phosphodiesterase-Aktivität von Phospholipase-D bei pH 5,6 (I) und pH 9,2 (II)

Zur mikrobiologischen Pantothersäurebestimmung

10,9 mg Synthetase (1530 mE/mg) wurden in 2,0 ml mit 25,6 mg Phospholipase D, 20 μMol CaCl_2 und 80 μMol Na-acetat pH 5,6 40 h bei 25° inkubiert. Danach waren gegenüber einer Kontrolle ohne Phospholipase D noch 6,3 % Restaktivität vorhanden. Der Ansatz wurde geteilt. 1 ml diente als Kontrolle für die Gesamtmenge an vorhandener Pantothersäure. 1 ml wurde durch Hitzedenaturierung von Protein befreit. Nach Zentrifugation und 2maligem Waschen wurde in den vereinigten Überständen Pantothersäure bestimmt. Die Ausführung dieser Bestimmung mit *Lactobacillus plantarum* ATCC 9080 verdanken wir Herrn W. Winnewisser (Lit. 30). Während in der Kontrolle 10,9 μMol Pantothersäure

gefunden wurden, waren in der proteinfreien Lösung nur 1,1 μMol zu finden.

Zu Kapitel III

Zu Abschnitt 1 (S.22)

1. Inkubationen mit 1- ^{14}C -Acetyl-pantethein

Zur radiogaschromatographischen Analyse der Endprodukte enthielt die Küvette abweichend vom Standard-Ansatz des optischen Synthetase-Testes (s.S. 72) im Volumen von 2,0 ml: 1,5 μMol NADPH, 61,2 γ Synthetase (1685 mE/mg), 0,3 μMol 1- ^{14}C -Acetyl-pantethein ($9,1 \times 10^6$ Ipm). Mit 1 μMol Malonylpantethein wurde die Reaktion gestartet und ihr Verlauf optisch an der Extinktionsabnahme bei 366 $\text{m}\mu$ verfolgt. Nach Verbrauch von 1,4 μMol NADPH wurde mit 0,1 ml 60 %iger Perchlorsäure gestoppt. Zum Vergleich der Endprodukte wurde ein entsprechender Versuch mit CoA-Derivaten durchgeführt: Abweichend vom obigen Ansatz wurden hier 0,3 μMol 1- ^{14}C -Acetyl-CoA ($9,45 \times 10^6$ Ipm) und 1 μMol Malonyl-CoA statt der Pantethein-Derivate eingesetzt. Die Aufarbeitung für die Gaschromatographie erfolgte nach alkalischer Hydrolyse wie üblich (S. 77 ; Veresterung der Säuren mit Diazomethan). Die Analyse verdanken wir Herrn M. Sumper. Wir konnten beobachten, daß die Kinetik der Fettsäuresynthese mit Pantethein-Derivaten länger linear war als mit CoA-Derivaten. Offenbar war hier die Endprodukthemmung geringer.

2. Synthese und Reinigung von Palmityl-pantethein

Analog zur Synthese von Palmityl-CoA erfolgte die Synthese von Palmityl-pantethein über das gemischte Anhydrid aus Chlorameisen-

säureester und Palmitinsäure und dessen Umsetzung mit Pantethein. Ausgehend von 89 μMol Palmitinsäure wurde in THF mit Chlorameisensäureäthylester und Triäthylamin das gemischte Anhydrid dargestellt. Es wurde mit einer wässrigen Lösung von 44,5 μMol Pantethein bei 0° und pH 9 zur Reaktion gebracht. Dabei trübte sich die Lösung und es fiel ein flockiger Niederschlag aus. Während 30 min wurde der pH-Wert durch Zugabe von N/10 NaOH auf pH 8-9 gehalten. Danach wurde die Mischung mit 2 N HCl schwach angesäuert und lyophilisiert. Der Rückstand wurde zur Entfernung der Salze mit 12 ml Wasser, zur Entfernung der überschüssigen Palmitinsäure mit 12 ml Petroläther und zur weiteren Reinigung mit 5 ml Essigester in der Wärme digeriert. Danach ergab das UV-Spektrum in Äthanol anhand der Thioesterabsorption einen Gehalt von 19 μMol (43 % Ausbeute) Thioester.

Das amorphe Präparat war in den meisten Lösungsmitteln wie Wasser, Methanol, Äther, THF, Petroläther, Essigester, Chloroform und Benzol nahezu unlöslich. In absolutem Äthanol war es etwas löslich, am besten löste es sich in Chloroform/Methanol (2:1); eine Kristallisation aus absolutem Äthanol gelang nicht.

Die Dünnschichtchromatographie in Chloroform/Methanol (2:1) zeigte noch eine Verunreinigung des Präparates (Rf-Wert 0,48) mit einer Thioesterverbindung (Rf-Wert 0,96). Diese Verunreinigung konnte durch präparative Dünnschichtchromatographie abgetrennt werden. Dabei verwendeten wir 1 mm dick mit Kieselgel G beschichtete Platten (Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1)). Die Substanz wurde am unteren Rand strichförmig aufgetragen; nach der Chromatographie wurde an beiden Seiten der Rand mit Thioesterreagenz (s. S.76) besprüht und so die Lage der Thioesterbanden

markiert. Das Kieselgel mit der Hauptbande wurde abgesaugt und mit Chloroform/Methanol eluiert. Bei der Elution wurden aus dem Kieselgel jedoch Stoffe herausgelöst, die wegen ihrer Eigenabsorption im UV um 230 m μ keine Thioesterabsorptionsmessung erlaubten. Diese Beobachtung machten wir bei mehreren Kieselgelsorten (Kieselgel G, PF, und auch HR der Firma Merck). Wir verwendeten das dünnschichtchromatographisch einheitliche Präparat als Referenz- und Trägersubstanz für die Versuche zur Identifizierung von radioaktivem Palmityl-pantethein.

3. Palmityl-pantethein als Endprodukt

Die Inkubation entsprach der für die Endproduktsanalyse (s.S. 89). Es wurden jedoch nur 0,15 μ Mol 1-¹⁴C-Acetyl-pantethein (4,5 x 10⁶ Ipm), 30 γ Synthetase (1685 mE/mg) und 0,5 μ Mol Malonyl-pantethein eingesetzt. Der Kontrollansatz enthielt kein Enzym. Die mit Perchlorsäure nach 15 min abgestoppten Ansätze wurden zentrifugiert und der Niederschlag zweimal mit 6 %iger Perchlorsäure gewaschen. Die Extraktion des Niederschlages mit 2 ml Chloroform/Methanol (2:1) ergab nur beim Enzymansatz eine radioaktive Lösung (850 000 Ipm), bei der Kontrolle ohne Enzym fand sich erwartungsgemäß keine Radioaktivität im Niederschlag. Vor der Dünnschichtchromatographie wurde als Träger Palmityl-pantethein und Acetyl-pantethein zugesetzt.

4. Palmityl-pantethein durch Austauschreaktion

Die Versuchsbedingungen entsprachen den von E. Schweizer für den Palmityltransferasetest beschriebenen Angaben (Lit. 13). Der Ansatz enthielt in 1,0 ml: 100 μ Mol KPO₄ pH 6,5, 10 μ Mol Cystein, 0,056 μ Mol 1-¹⁴C-Palmityl-CoA (400 000 Ipm) 0,6 mg

Serumalbumin, 0,235 μ Mol Pantethein und 15 γ Synthetase (1200 mE/mg). Die Kontrolle enthielt alle Zusätze außer Synthetase. Nach 15 min Inkubation bei 25° wurde die Reaktion mit 0,1 ml 60 %iger Perchlorsäure abgestoppt. Der säureunlösliche Niederschlag wurde wie oben (3.) aufgearbeitet und der Dünnschichtchromatographie unterworfen.

Zu Abschnitt 2 (S. 30)

Synthetasetest

Bei der Kettenlängenabhängigkeit und allen Substratabhängigkeiten im späteren Teil der Arbeit galten, wenn nicht anders angegeben, folgende Bedingungen des optischen Testes: Abweichend vom Standardtest (s.S.72) enthielt die Küvette 24,8 γ Synthetase (2200mE/mg) und 0,13 μ Mol Malonyl-CoA. Statt Acetyl-CoA wurden die jeweils angegebenen Mengen an Acyl-CoA eingesetzt.

Zu Abschnitt 3 (S. 35)

Endprodukte der Synthese mit Decanoyl-CoA

Der Ansatz enthielt in 2 ml 200 μ Mol KPO_4 pH 6,5, 20 μ Mol Cystein, 0,6 mg Serumalbumin, 0,5 μ Mol NADPH, 207 γ Synthetase (250 mE/ 1200 mE/mg), 52 μ Mol 1-¹⁴C-Decanoyl-CoA (950 000 Ipm). Mit 0,12 μ Mol Malonyl-CoA wurde gestartet. Nach 10 min wurde wie üblich mit 1 ml methanolischer KOH gestoppt und aufgearbeitet (Trägerzusatz: je 2,5 μ Mol der gesättigten geradzahligen Fettsäuren C₁₀-C₁₈).

Zu Abschnitt 4 (S.39)

1. DL-3-Hydroxydecansäure

Diese β -Hydroxysäure wurde nach Reformatzky (analog Lit. 65) aus Octanal und Bromessigsäuremethylester mit Zink dargestellt. Wir erhielten die Säure aus Petroläther in farblosen nadelförmigen Kristallen (Ausbeute 28 %). Fp. 57-58°.

2. 2-Decensäure

Diese α,β -ungesättigte Säure wurde in einer Knoevenagel-Doebner-Kondensation aus Octanal und Malonsäure dargestellt (analog Lit. 65). Wir erhielten die Säure nach Vakuumdestillation als farbloses Öl (Kp.₁ 109-111°; n_D^{20} 1,4618 (Lit. n_D^{20} 1,4616)). Der Methylester war gaschromatographisch rein.

3. 3-Hydroxydecanoyl-CoA

Zur Gehaltsbestimmung konnte neben den allgemeinen Bestimmungsmethoden eine enzymatische Methode benutzt werden mit β -Hydroxyacyl-Dehydrogenase (HOADH).

In eine Küvette wurden gegeben (Vol. 1,0 ml): 160 μ Mol Tris pH 8,1, 220 μ Mol Hydrazinhydrat, 3 μ Mol NAD^+ und wechselnde Mengen des CoA-Derivates. Die Extinktion bei 334 m μ wurde abgelesen und nach Zugabe von 0,01 ml HOADH die Extinktionsänderung bestimmt. Der daraus berechnete Acyl-CoA-Gehalt war nur halb so groß wie der einer Thioesterbestimmung, da nur die L-Form der Hydroxyverbindung vom Enzym umgesetzt wird.

4. 2-Decenoyl-CoA

Das Differenzspektrum von 2-Decenoyl-CoA zeigte zwar wie erwartet zwei Maxima bei 225 und 263 μ m, doch entsprach das Verhältnis der Extinktionswerte der beiden Maxima (E_{225} und E_{263}) nicht dem der bekannten Extinktionskoeffizienten, die für Crotonyl-N-acetylcysteamin bestimmt worden waren (Lit. 66). Wir führten dies auf eine Verunreinigung durch das Additionsprodukt von CoA an die Doppelbindung der α,β -ungesättigten CoA-Verbindung zurück. Bei der Darstellung von Crotonyl-CoA etwa war ein solches Additionsprodukt nachgewiesen worden (Lit. 66). Wir versuchten eine Abtrennung der entsprechenden Verbindung durch Papierelektrophorese, Gegenstromverteilung an Sephadex G 50 und Chromatographie an Dowex-2 zu erreichen. Es gelang uns mit diesen Methoden jedoch weder der Nachweis einer Additionsverbindung noch eine Reinigung des CoA-Derivates.

5. Optische Tests

a) Zeitabhängigkeit (Fig. 23)

Abweichend vom Standard-Synthetase-Test enthielt die Küvette 99 μ Mol DL-3-Hydroxydecanoyl-CoA statt Acetyl-CoA, 277 γ Synthetase (324 mE; 1170 mE/mg). Start mit 0,13 μ Mol Malonyl-CoA). Gemessen wurde ΔE_2 (s. Fig. 24) in Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit ohne Malonyl-CoA.

b) Zur Messung von ΔE_1

Ansatz wie unter a), jedoch 4fache Menge Synthetase (1,11 mg; 1170 mE/mg). Messung bei 334 μ m im Cary-Spektralphotometer mit Vergleichsküvette, die alle Zusätze außer 3-Hydroxydecanoyl-CoA enthielt. Wir maßen $\Delta E_1 / 10 \text{ min} = 0,093$. Daraus berechnete

sich für den Ansatz a) bei einer Vorinkubationszeit von 10 min ein ΔE_2 von 0,14. Wir fanden bei a) ein ΔE_2 von 0,16 (Fig. 23).

c) Vergleich von 3-Hydroxydecanoyl-CoA und 2-Decenoyl-CoA
(Fig. 27)

Abweichend vom Standardsynthetasetest enthielt die Küvette statt Acetyl-CoA die angegebenen Mengen der beiden CoA-Derivate, 0,6 μMol NADPH, 415 γ Synthetase (500 mE; 1200 mE/mg). Nach 10 min Vorinkubation wurde 0,12 μMol Malonyl-CoA zugesetzt und ΔE_2 gemessen.

d) 3-Hydroxypropionyl-CoA

Bedingungen des Synthetasestandardtestes. Statt Acetyl-CoA 97 μMol 3-Hydroxypropionyl-CoA, 167 γ Synthetase (315 mE; 2000 mE/mg). Nach 20 min war ΔE nach Zugabe von Malonyl-CoA genau so groß wie mit Malonyl-CoA allein (Kontrolle) ($\Delta E = 0,035$). Auch mit der 4fachen Enzymmenge ließ sich kein Umsatz feststellen.

e) Versuche mit NÄM-Synthetase

Hemmung durch NÄM

1,47 mg Synthetase (2040 mE/mg) wurden in einem Volumen von 1 ml bei 0° mit 10 μMol NÄM (10^{-2} M) inkubiert. Die Hemmung wurde mit Aliquoten der Mischung im optischen Synthetasetest zeitlich verfolgt (Fig. 42). Nach 30 min (Restaktivität 2 %; 44 mE/mg) wurde die Reaktion mit Cystein in 10fachem Überschuß gestoppt. Eine andere Präparation wurde bereits nach 5 min NÄM-Einwirkung gestoppt (Restaktivität 4 %).

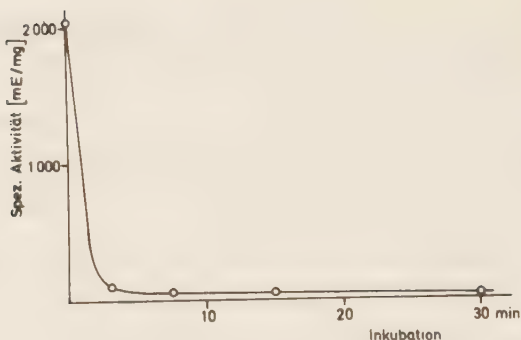


Fig. 42: Hemmung der Synthetase durch NÄM

Messung von ΔE_2 mit und ohne NÄM-gehemmte Synthetase (Fig. 26)

Die Testbedingungen entsprachen denen von Figur 23. Es wurden jeweils 326 γ ungehemmte Synthetase (665 mE; 2040 mE/mg) eingesetzt. Nach verschieden langer Vorinkubation (0,5 - 15 min) wurde mit 0,12 μ Mol Malonyl-CoA gestartet und der NADPH-Verbrauch ΔE_2 bestimmt (Kontrolle).

Bei den Versuchen mit NÄM-gehemmter Synthetase wurde diese (70-326 γ) zunächst allein mit 3-Hydroxydecanoyl-CoA vorinkubiert (10-20 min). Dann erst wurden 326 γ ungehemmte Synthetase zugesetzt. Nach erneuter Vorinkubation (0,5 - 15 min) wurde mit Malonyl-CoA gestartet und ΔE_2 bestimmt.

6. Endproduktanalyse (Fig. 28)

Abweichend vom Standardansatz des optischen Testes enthielt die Küvette 0,7 μ Mol NADPH, 518 γ Synthetase (1200 mE/mg), 395 μ Mol DL-3-Hydroxydecanoyl-CoA bzw. 216 μ Mol 2-Decenoyl-CoA. Nach 30 min Vorinkubation ohne Malonyl-CoA wurde mit 70 μ Mol 1- 14 C-

Malonyl-CoA ($1,2 \times 10^5$ Ipm) gestartet und nach 5 min mit methanolischer KOH abgestoppt. Der NADPH-Verbrauch wurde optisch verfolgt. Aufarbeitung für die Gaschromatographie s. S. 77 (Trägerzusatz: je $2,5 \mu\text{Mol}$ der gesättigten geradzahigen Fettsäuren C_{10} - C_{18} , sowie der 3-Hydroxydecan- bzw. 2-Decensäure).

Zu Abschnitt 5 (S. 49)

1) Synthese der Säuren

a) 4-Ketodecansäure

Önanthaldehyd (Heptanal) wurde radikalisch an Maleinsäurediäthylester addiert (Lit. 67). Aus dem entstandenen Önanthoylbernsteinsäure-diäthylester wurde nach Verseifung und Decarboxylierung die 4-Ketodecansäure erhalten.

0,492 Mol (56,2 g) Heptanal (frisch dest.) wurden zusammen mit 0,209 Mol (36,2 g) Maleinsäurediäthylester (frisch dest.) auf 84° erhitzt und 1 g Benzoylperoxid (Th. Schuchardt) zugesetzt. Die Temperatur wurde auf $1-2^\circ$ konstant gehalten. Dauer der Reaktion: 24 Stunden; nach 7 h wurde erneut 1 g Benzoylperoxid zugesetzt. Nach fraktionierter Destillation erhielten wir 41,4 g (69 % d. Th.) rohen Önanthoylbernsteinsäurediäthylester (Kp_5 $160-170^\circ$). Der rohe Ester wurde mit 101 ml H_2SO_4 (konz.) in 180 ml H_2O 3 h zum Sieden erhitzt, wobei der gebildete Alkohol abdestillierte. Der braune Rückstand wurde in Benzol aufgenommen und die Benzollösung mit 2 N NaOH ausgeschüttelt. Aus der alkalischen Lösung wurde mit konz. HCl die Säure freigesetzt, die alsbald kristallisierte. Ausbeute: 26 g rohe Säure (96 % d. Th.). Durch Umkristallisation aus Äthanol/Wasser wurde die Säure in

glänzenden feinen Nadeln erhalten. Fp. 69° . Semicarbazon Fp. 161° . Der Methylester der Säure war gaschromatographisch rein.

b) 7-Ketodecansäure

Bei der Methode der Kettenverlängerung von Säuren um 6 C-Atome nach Hünig wird Morpholinocyclohexen mit einem Säurechlorid acyliert. Das Acylierungsprodukt ergibt nach Hydrolyse ein Diketon, das im Alkalischen der Säurespaltung unterliegt. Die dabei entstehende Säure ist eine Ketosäure, die normalerweise zur gesättigten Säure reduziert wird (Lit. 68).

0,268 Mol (47,75 g) Morpholinocyclohexen (aus Cyclohexanon und Morpholin dargestellt) wurden zusammen mit 0,293 Mol (29,6 g) Triäthylamin in 125 ml Chloroform gelöst. Bei 25° Badtemperatur wurde unter Rühren tropfenweise 0,244 Mol (22,85 g) Butyrylchlorid in 50 ml Chloroform zugegeben. Die Mischung wurde noch 1 h bei 35° weitergerührt und dann über Nacht bei RT stehen gelassen. Dann wurde mit 125 ml 20 % HCl 5 h unter Rückfluß gekocht, die Chloroformschicht abgetrennt und neutral gewaschen. Die auf pH 5-6 gebrachte wässrige Phase wurde 5mal mit Chloroform extrahiert. Aus den vereinigten Chloroformphasen wurde nach Trocknen und Abziehen des Lösungsmittels das rohe Diketon erhalten.

Das Diketon wurde auf 100° erhitzt und mit einer ebenfalls auf 100° erhitzten Lösung von 0,713 Mol (40 g) KOH in 29 ml H_2O unter Rühren versetzt. Nach heftiger Reaktion rührte man noch 5 min weiter und ließ dann erkalten, wobei die Mischung erstarrte. Nach Zusatz von 500 ml H_2O und konz. HCl bis zu einem pH-

Wert von 7-8 wurde 2mal mit Petroläther extrahiert. Nach starkem Ansäuern wurde 3mal mit Chloroform extrahiert. Aus den CHCl_3 -Phasen wurde nach Trocknen über Na_2SO_4 und Abziehen des Lösungsmittels ein dunkelgelb gefärbtes Öl erhalten, das nach einiger Zeit erstarrte. Ein Teil dieses stark verunreinigten Produktes wurde durch Umkristallisation aus Petroläther und Chromatographie an einer Al_2O_3 -Säule gereinigt. Wir erhielten etwa 1 g reine Säure in farblosen Kristallen. Fp. $40-41^\circ$. Semicarbazon Fp. 157° .

c) 10-Hydroxydecansäure

Die Synthese ging von 10-Undecensäure aus, die mit LiAlH_4 zum 10-Undecenol reduziert wurde. Die Hydroxygruppe wurde durch Acylierung geschützt. Anschließend erfolgte oxidative Spaltung der Doppelbindung mit KMnO_4 . Umesterung und Verseifung führte zur ω -Hydroxysäure (Lit. 69).

Wir erhielten aus 0,25 Mol (46 g) 10-Undecensäure (Undecylen-säure (Merck)) durch Reduktion mit 8 g LiAlH_4 in 75 ml absolutem Äther 20,5 g (48,5 % d. Th.) 10-Undecenol (Kp.₁₂ $124-128^\circ$, n_D^{20} 1,4504 (Lit. 1, 4509)).

0,1 Mol (16,9 g) Undecenol wurde mit 0,1 Mol (10,2 g) Acetanhydrid in 0,12 Mol (9,5 g) Pyridin acyliert (3 h Rückflußkochen). Nach Entfernung des Pyridins mit HCl (Mischung in Eiswasser geben, mit HCl ansäuern und mit Äther extrahieren; Ätherphasen mit 10 % HCl waschen) erhielten wir 14,7 g (70 % d. Th.) Undecenolacetat (Kp.₁ $105-109^\circ$; n_D^{20} 1,4390).

0,070 Mol (14,7 g) Undecenolacetat wurden in 150 ml Eisessig gelöst und unter Rühren mit 38,3 g feingepulvertem KMnO_4 ver-

setzt, wobei die Temperatur nicht über 70° stieg. Dann wurde die Mischung noch 15 min auf dem Wasserbad erhitzt, abgekühlt und mit dem gleichen Volumen Äther versetzt. Nach 1 h wurde MnO_2 weitgehend abfiltriert. Nach Zusatz von Wasser wurde die Ätherphase abgetrennt und mit 10 %iger K_2CO_3 -Lösung ausgezogen. Nach Ansäuern und Extraktion mit Äther erhielt man ein rohes Öl, das in methanolischer HCl gelöst und zum Sieden erhitzt wurde. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit 10 %iger methanolischer KOH verseift. Durch Ansäuern, Ätherextraktion und Abziehen des Äthers erhielten wir schließlich einen kristallinen Rückstand, aus dem sich in sehr geringen Mengen durch Umkristallisation aus Wasser die ω -Hydroxydecansäure gewinnen ließ (Fp. $71-73^{\circ}$). Der Methylester verhielt sich in der Gaschromatographie ähnlich wie β -Hydroxydecansäuremethylester. Im Gaschromatogramm waren etwa 5 % an Sebacinsäure als Verunreinigung festzustellen.

d) Sebacinsäuremonomethylester

Der Monomethylester wurde aus Sebacinsäuredimethylester durch partielle Verseifung erhalten (Lit. 69).

0,1 Mol (23 g) Sebacinsäuredimethylester (Kp._2 $106-108^{\circ}$) wurden in 5 ml Methanol zum Sieden erhitzt und mit einer heißen methanolischen Lösung von 0,1 Mol KOH (2N) versetzt. Nach 10 min ließ man abkühlen, säuerte die Mischung mit HCl an und setzte Äther hinzu. Aus der Ätherphase wurden die sauren Substanzen mit gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung extrahiert. Beim Ansäuern der Bicarbonat-Lösung schied sich ein festes Produkt ab, das wieder mit Äther aufgenommen wurde. Nach Trocknen der Ätherphase und Abziehen des Lösungsmittels blieb ein farbloser fester

Rückstand (8,1 g = 39 % d. Th.), der im Vakuum destilliert werden konnte. (Kp.₂ 165°; Fp. 37-39°) .

e) Korksäuremonomethylester (Lit. 70)

0,25 Mol (43,5 g) Korksäure wurden mit 0,25 Mol (50,5 g) Korksäuredimethylester, 4 g Methanol, 9 g H₂O und 1 g β -Naphthalinsulfonsäure 12 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die erstarrte Mischung in Äther suspendiert und fraktioniert mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung extrahiert. Aus den ersten Fraktionen schied sich beim Ansäuern in großer Menge ätherunlösliche unveränderte Korksäure ab. Aus späteren Fraktionen erhielten wir beim Ansäuern ein ätherlösliches farblores Öl, das im Vakuum destilliert wurde (Kp.₁ 138-141°). Ausbeute: 10 g (11 % d. Th.).

2. Endproduktanalysen

Bei allen Ansätzen wurden die Inkubationen in einer Küvette ausgeführt, um den NADPH-Verbrauch bei 334 m μ verfolgen zu können. Abstoppen der Reaktion erfolgte unmittelbar nach Verbrauch des Malonyl-CoA durch Zusatz von 1 ml 10 %iger methanolischer KOH. Aufarbeitung für die Gaschromatographie wie üblich (s. S.77).

Zu Fig. 33 (S. 57)

Abweichend vom Standardsynthetasetest enthielt der Ansatz 207 γ Synthetase (250 mE; 1200 mE/mg) 0,5 μ Mol NADPH, statt Acetyl-CoA 134 m μ Mol 3-Decenoyl-CoA und 0,15 μ Mol 2-¹⁴C-Malonyl-CoA*) (1,65 x 10⁵ Ipm). Nach 10 min wurde die Reaktion gestoppt. Trä-

*) 2-¹⁴C-Malonyl-CoA erhielten wir von Herrn M. Sumper.

gerzusatz; je 2,5 μMol Palmitoleinsäure und Vaccensäure, je 1 μMol Palmitin- und Stearinsäure, sowie 3-Decensäure.

Die katalytische Hydrierung der Methylester erfolgte mit H_2/PtO_2 in absolutem Methanol (12 h).

Die oxidative Spaltung einer Doppelbindung wurde wie folgt ausgeführt: Zu der ungesättigten Verbindung wurden gegeben: 2 ml Oxidationslösung (0,0025 M KMnO_4 , 0,018 M NaJO_4), 1 ml 0,1 M Na_2CO_3 , 0,5 ml H_2O , 1,5 ml tert.-Butanol. Nach 4 h Schütteln des verschlossenen Gefäßes bei RT wurde eine Spatelspitze $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ zugesetzt. Nach Zugabe eines NaOH-Plättchens ließ man 30 min bei 60° stehen. Nach Entfernung des tert.-Butanol am Rotationsverdampfer bei $15-20^\circ$ wurde mit 2 N H_2SO_4 angesäuert. Zur Isolierung der gebildeten Säuren schloß sich eine Petrolätherextraktion an.

Zu Figur 34 (S.58)

Bedingungen des Standardsynthetasetestes; davon abweichend statt Acetyl-CoA 134 μMol 3-Decenoyl-CoA, 455 γ Synthetase (550 mE; 1200 mE/mg), 1 μMol NADPH. Bei A) wurden sofort bei B) erst nach 2 Stunden Vorinkubation 70 μMol 1- ^{14}C -Malonyl-CoA ($1,2 \times 10^5$ Ipm) zugesetzt. Nach 5 min wurde die Reaktion gestoppt. Trägerzusatz: je 1 μMol Palmitoleinsäure und Vaccensäure und je 0,5 μMol Laurin-, Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure.

Zu Figur 35 (S. 60)

Bedingungen des Standardsynthetasetestes; davon abweichend statt Acetyl-CoA 256 μMol 4-Ketodecanoyl-CoA, 0,5 μMol NADPH, 207 γ Synthetase (250 mE; 1200 mE/mg). Bei A) wurden sofort bei B) erst nach 20 min Vorinkubation 150 μMol 2- ^{14}C -Malonyl-

CoA ($1,65 \times 10^5$ Ipm) zugesetzt. Nach 5 min wurde die Reaktion gestoppt. Trägerzusatz: 2,5 μ Mol 4-Ketodecansäure. Die gesättigten Fettsäuren $C_{10}-C_{20}$ wurden erst bei der Gaschromatographie zugesetzt. Ein Teil des Ansatzes B) wurde der Trimethylsilierung unterworfen (Lit. 64).

Die Ziffern in den Chromatogrammen sollen die Radioaktivitätsgipfel kennzeichnen und sie von den mit Buchstaben gekennzeichneten Gipfeln der Referenzsäuren (im Massendiagramm) unterscheiden.

Aus Figur 35 B läßt sich entnehmen, daß etwa 50 % der Ketoverbindung während der 20 minütigen Vorinkubation reduziert wurden (128 μ Mol von 250 mE Synthetase). Daraus ergibt sich eine Reduktionsgeschwindigkeit, die 2,5 % der normalen Synthesegeschwindigkeit erreicht. Aus dem optischen Verlauf der Vorinkubation berechneten wir einen Wert von 1,8 %.

In analoger Weise errechneten wir aus Figur 34 B (50 % Reduktion der ungesättigten Verbindung in 120 min; 67 μ Mol von 550 mE Synthetase) für diese Reduktionsgeschwindigkeit, 0,1 % der normalen Synthesegeschwindigkeit.

Zu Figur 37 (S. 62)

Bedingungen des Standardsynthetasetestes; davon abweichend statt Acetyl-CoA 256 μ Mol 4-Ketodecanoyl-CoA, 1 μ Mol NADPH, 455 γ Synthetase (550 mE; 1200 mE/mg). Bei Ansatz A) wurden sofort 70 μ Mol 1- 14 C-Malonyl-CoA ($1,2 \times 10^5$ Ipm) zugesetzt. Die Reaktion wurde hier mit 0,08 ml 4 N KOH gestoppt und 0,8 ml M/10 Kaliumborhydrid-Lösung zugesetzt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde mit 0,12 ml 5 N HCl zur Zerstörung von überschüssigem KBH_4 angesäuert. Dann wurde 1 ml methanolische KOH zugesetzt. Bei Ansatz B) wurde erst nach 2 h Vorinkubation 70 μ Mol 1- 14 C-

Malonyl-CoA ($1,2 \times 10^5$ Ipm) zugesetzt. Nach 5 min wurde die Reaktion gestoppt. Trägerzusatz bei A) und B); $1 \mu\text{Mol}$ 4-Ketodecansäure.

Je ein Teil von Ansatz A) und B) wurde der Trimethylsilierung unterworfen (Lit. 64). Die Analyse nach Trimethylsilierung von B) zeigt Figur 37 C. Bei A) erhielten wir ein entsprechendes Chromatogramm.

Auf polaren Säulen (z.B. 15 % PEGS (2m) 175°) hatten die radioaktiven Säuren wie erwartet sehr lange Retentionszeiten (z.B. Gipfel 4a 71 min und 4 80 min).

V. Zusammenfassung

Die Fettsäuresynthetase wurde als lösliches Protein des Zytoplasmas gekennzeichnet. Für diese Lokalisierung der Synthetase in der Hefezelle wurde ein schonendes Zellaufschlußverfahren unter Verwendung von Hefeprotoplasten benutzt. Der Zellinhalt wurde der fraktionierten Zentrifugation und der Analyse im Rohrzuckergradienten unterworfen. Eine Bindung der Synthetase an Zellstrukturen ließ sich mit diesen Methoden nicht nachweisen.

Auch ein Lipidgehalt der Synthetase wurde in Frage gestellt.

Eine Inaktivierung der Synthetase durch Phospholipase-D wurde beschrieben.

Pantethein konnte Coenzym A bei der Fettsäuresynthese vollständig ersetzen. Als Endprodukt dieser Synthese wurde Palmitylpantethein gefunden. Auch die Bildung von Palmitylpantethein aus Palmityl-CoA und Pantethein durch Austauschreaktion an der Synthetase wurde nachgewiesen.

Acetyl-CoA wurde als Starter der Synthese durch verschiedene CoA-Derivate ersetzt:

Die Spezifität der Synthetase im Hinblick auf die Kettenlänge des gesättigten Starters wurde untersucht. Dabei erwiesen sich Nonanoyl-CoA und Decanoyl-CoA als auffallend gute Starter.

Eine Konkurrenz zwischen Decanoyl-CoA und Malonyl-CoA bei der Synthese wurde beschrieben und als mögliche Erklärung für die Substrathemmung hingestellt, die beim Start der Synthese mit höheren Acyl-CoA-Derivaten beobachtet wurde.

Fettsäuresynthese fand in geringem Maße auch mit CoA-Derivaten von nicht-gesättigten Zwischenstufen der Synthese statt.

3-Hydroxydecanoyl-CoA und 2-Decenoyl-CoA wurden vom Enzym zu Decanoyl-CoA umgewandelt, das mit Malonyl-CoA unter Bildung der normalen Endprodukte reagierte. Geschwindigkeitsbestimmend war dabei die Übertragung des nichtgesättigten Acylrestes auf das Enzym.

Der Start der Synthese mit CoA-Derivaten, deren Acyl-Rest bei einer Kettenlänge von zehn Kohlenstoffatomen funktionelle Gruppen in verschiedenen Positionen trugen, wurde beschrieben. Der Erhalt der funktionellen Gruppe bei der Kettenverlängerung wurde in einigen Fällen nachgewiesen. So ergab z.B. die Analyse der Endprodukte einer Synthese, die mit 3-Decenoyl-CoA gestartet worden war, die Bildung ungesättigter Säuren.

Die relativ rasche enzymatische Reduktion einer Ketogruppe in 4-Stellung und die langsamere Reduktion einer Doppelbindung in β,γ -Stellung des Acylrestes durch die Synthetase wurde nachgewiesen.

VI. Literaturverzeichnis

1. Lynen, F., Fed.Proc. 20, 941 (1961)
2. Hsu, R.Y., Wasson, G. und J.W. Porter, J. Biol. Chem. 240, 3736 (1965)
3. Majerus, P.W., Alberts, A.W. und P.R. Vagelos, J. Biol. Chem. 240, 4723 (1965)
4. Pugh, E.L. und S.J. Wakil, J. Biol. Chem. 240, 4727 (1965)
5. Brooks, J.L. und P.K. Stumpf, Biochim. Biophys. Acta 96 213 (1965)
6. Lynen, F., in M.Sela "New Perspectives in Biology", Vol. 4, Elsevier, Amsterstam (1964)
7. Stoffel, W., in 16. Mosbacher Koll. "Lipoiden" S. 64 (1966)
8. Light, R.J., Lennarz, W.J. und K. Bloch, J. Biol. Chem. 237 1793 (1962)
9. Schultz, J., Dissertation, Universität München (1968)
10. Kuhn, N.J. und F. Lynen, Biochem. J. 94, 240 (1965)
11. Lynen, F., Wiener Klinische Wochenschrift 78, 489 (1966)
12. Oesterheld, D., Dissertation, Universität München (1967)
13. Schweizer, E., Dissertation, Universität München (1963)
14. Sumper, M., Oesterheld, D., Riepertinger, C. und F. Lynen, European J. Biochem. 10, 377 (1969)
15. Lynen, F., Oesterheld, D., Schweizer, E. und K. Willecke in "Cellular Compartmentalization and Control of fatty acid metabolism", S. 1-24, Oslo (1968)
16. Lampen, J.O., Antonie van Leeuwenhoek 34, 1 (1968)
17. Eddy, A.A. und D.H. Williamson, Nature 197, 1252 (1957)
18. Darling, S., Theilade, J. und A. Birch-Andersen, J. Bacteriol. 98, 797 (1969)
19. Ohnishi, T., Kawaguchi, K. und B. Hagihara, J. Biol. Chem. 241, 1797 (1966)
20. Duell, E.A., Inoue, S. und M.F. Utter, J. Bacteriol. 88, 1762 (1964)
21. Nurminen, T., Oura, E. und H. Suomalainen, Suomen Kemistilehti B 38, 283 (1965)
22. Potter, V.R. und C.A. Elvehjem, J. Biol. Chem. 114, 495 (1936)
23. Allfrey, V. in J. Branchet und A.E. Mirsky (eds.) "The Cell"

Vol. I, 193, Academic Press, New York (1959)

24. Martin, R.G. und B.N. Ames, J. Biol. Chem. 236, 1372 (1961)
25. Kennedy, E.P. und S.B. Weiss, J. Biol. Chem. 222, 193 (1956)
26. Sund, H. und K. Weber, Angew. Chem. 78, 217 (1966)
27. Oesterheld, E., unveröffentlichte Versuche
28. Yang, S.F., Freer, S. und A.A. Benson, J. Biol. Chem. 242, 477 (1967)
29. Hayaishi, O., in "Methods of Enzymology" Vol. I, S. 666 Academic Press, New York (1955)
30. Winnewisser, W., Diplomarbeit, Universität München, 1969
31. Lynen, F., Hopper-Kessel, I. und H. Eggerer, Bio. Z. 340, 95 (1964)
32. Sumper, M., Dissertation, Universität München, in Vorbereitung
33. Lust, G. und F. Lynen, European J. Biochem. 7, 68 (1968)
34. Ayling, J., Fries, R. und F. Lynen, in Vorbereitung
35. Wakil, S.J. und J. Ganguly, J. Amer. Chem. Soc. 81, 2597 (1959)
36. Lynen, F., Colloqu. Intern. Centre Nat. Recherche Sci. 99, 71 (1961)
37. Willecke, K., Dissertation, Universität München (1968)
38. Ziegenhorn, J., Diplomarbeit, Universität München (1967)
39. Lynen, F., Biochem. J. 102, 381 (1967)
40. Simon, E.J. und D.J. Shemin, J. Amer. Chem. Soc. 75, 2520 (1953)
41. Eggerer, H. und F. Lynen, Bio. Z. 335, 540 (1962)
42. Wieland, Th. und L. Rueff, Angew. Chem. 65, 186 (1953)
43. Matsushashi, M., Matsushashi, S. und F. Lynen, Bio. Z. 340, 263 (1964)
44. Numa, S., Ringelmann, E. und F. Lynen, Biochem. Z. 343 255 (1965)
45. Buckel, W. und H. Eggerer, Bio. Z. 343, 29 (1965)
46. Hagen, A., Dissertation, Universität München (1963)
47. Kuhn, R. und G. Quadbeck, Chem. Ber. 84, 844 (1951)
48. Wessely, L., Dissertation, Universität München (1955)
49. Rétey, J., persönliche Mitteilung
50. Stadtman, E.R. in "Methods in Enzymology", 3, 931/938 (1962)
51. Lynen, F., Liebigs Ann. Chem. 574, 33 (1951)

52. Lands, W. und P. Hart, J. Biol. Chem. 240, 1905 (1965)
53. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. und G. Pfeleiderer, Zeitschr. f. Naturforsch. 8b, 55 (1953)
54. Jacobs, E.E., Jacobs, M., Sanadi, D.R. und L.B. Bradley, J. Biol. Chem. 223, 147 (1956)
55. Murphy, J. B. und M.W. Kies, Biochim. Biophys. Acta 45, 382 (1960)
56. Warburg, O. und W. Christian, Bio. Z. 310, 384 (1952)
57. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und R.J. Randall, J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
58. Nervi, A.M., Brenner, R.R. und R.O. Peluffo, Biochim. Biophys. Acta 152, 539 (1968)
59. Cramer, F. "Papierchromatographie" S. 164, Verlag Chemie, Weinheim (1962)
60. Bandurski, R.S. und B. Axelrod, J. Biol. Chem. 193, 405 (1951)
61. Levine, C. und E. Chargaff, J. Biol. Chem. 192, 465 (1951)
62. Maurer, H.R. "Disk-Elektrophorese" S. 42, Walter de Gruyter, Berlin (1968)
63. Tallan, H.H., Jones, M.E. und J.S. Fruton, J. Biol. Chem. 194, 793 (1952)
64. Hamprecht, B., Dissertation, Universität München (1968)
65. Stoffel, W., Caesar, H. und R. Ditzler, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 339, 191 (1964)
66. Seubert, W., Dissertation, München (1955)
67. Patrick, T.M. jr. und F.B. Erickson "Org. Synth." 34, 51 (1954)
68. Hünig, S. et al., Chem. Ber. 91, 129 (1958)
69. Grün, A. und Th. Wirth, Chem. Ber. 55, 2206 (1922)
70. Ziegler, K. und W. Hechelhammer, Liebigs Ann. Chem. 528, 130 (1937)
71. Klein, H.P., Volkmann, C.M. und F. Chao, J. Bacteriol. 93, 1966 (1967)
72. Stoffel, W., Ditzler, R. und H. Caesar, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 339, 167 (1964)
73. Norris, A.T., Matsamura, S. und K. Bloch, J. Biol. Chem. 239, 3653 (1964).

Lebenslauf

Am 21. Januar 1942 wurde ich in Berlin geboren. Meine Eltern sind André Pirson, Universitätsprofessor in Göttingen, und Anneliese Pirson, geb. Arp.

Nach dem Besuch der Volksschule trat ich 1952 in Marburg in das Humanistische Gymnasium Philippinum ein. 1957 übersiedelten meine Eltern nach Göttingen. Dort besuchte ich bis zum Abitur 1961 das altsprachliche Max-Planck-Gymnasium. Im Mai 1961 begann ich an der Universität Göttingen das Studium der Chemie und bestand dort im November 1964 die Diplom-Vorprüfung. Ab Wintersemester 1964/65 studierte ich an der Universität München, wo ich im Mai 1966 das Diplom-Hauptexamen ablegte. Von Oktober 1966 bis Oktober 1969 führte ich am hiesigen Max-Planck-Institut für Zellchemie und am Biochemischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen vorliegende Diplom- und Doktorarbeit aus.

